

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1938-1939.

SÉRIE U. N° 31.

RECHERCHES SUR LA PURIFICATION DE LA LACCASE



THÈSE

pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris
(Pharmacie)

Présentée et soutenue le

1939

PAR

CHARLES CAMPORA

PHARMACIEN,

INTERNE EN MÉDECINE DE L'HÔPITAL PRINCE ALBERT (MONACO),

ANCIEN ÉLÈVE DE L'INSTITUT PASTEUR,

DIPLOMÉ DE SÉROLOGIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS.

EX-MONITEUR DES TRAVAUX PRATIQUES A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS.

JURY { MM. HÉRISSEY, Président.
R. FABRE, Professeur.
P. FLEURY, Agrégé.



LONS-LE-SAUNIER.

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME.

—
1939

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1938-1939.

SÉRIE U. N° 31.

RECHERCHES SUR LA PURIFICATION DE LA LACCASE

THÈSE

pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris
(Pharmacie)

Présentée et soutenue le

1939

PAR

CHARLES CAMPORA

PHARMACIEN,

INTERNE EN MÉDECINE DE L'HÔPITAL PRINCE ALBERT (MONACO),

ANCIEN ÉLÈVE DE L'INSTITUT PASTEUR,

DIPLÔMÉ DE SÉROLOGIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS.

EX-MONITEUR DES TRAVAUX PRATIQUES A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS.

JURY { MM. HÉRISSEY, Président,
R. FABRE, Professeur,
P. FLEURY, Agrégé.

LONS-LE-SAUNIER.

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME.

1939

Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

ADMINISTRATION

MM. A. DAMIENS, Doyen, O. *, ☉ I.
 P. LEBEAU, Assesseur, O. *, ☉ I., Membre de l'Institut.
 H. J. LIONNET Secrétaire, ☉ I.

PROFESSEURS

MM. LEBEAU, O. *, ☉ I., Membre
 de l'Institut..... Pharmacie chimique.
 GORIS, O. *, ☉ I..... Pharmacie galénique.
 DAMIENS, O. *, ☉ I..... Chimie minérale.
 HÉRISSEY, O. *, ☉ I..... Chimie biologique.
 SOMMELET, *, ☉ I..... Chimie organique.
 LUTZ, *, ☉ I..... Cryptogamie et Micro-
 biologie.
 FABRE, *, ☉ I..... Toxicologie.
 LAUNOY, O. *, ☉ I..... Zoologie.
 DELABY, *, ☉ I..... Chimie analytique.
 PICON, *, ☉ I..... Physique.
 MASCRÉ, ☉ I..... Histoire naturelle des médicaments simples
 d'origine végétale.
 BACH, *, ☉ I..... Botanique générale.

Doyens honoraires : MM. RADAIS, O. *, ☉ I. — GUÉRIN, O. *, ☉ I.

Professeurs honoraires :

MM. BÉHAL, G. O. *, ☉ I. et DELÉPINE, O. *, ☉ I., membres de l'Institut,
 PERROT, C. *, ☉ I., COUTIÈRE, O. *, ☉ I., BOUGAULT, O. *, ☉ I.,
 et TASSILLY, O. *, ☉ I.

MAITRES DE CONFÉRENCES

MM. FLEURY, ☉ I..... Hydrologie et Hygiène.
 BEDEL, ☉ I..... Minéralogie, Législation et Déontologie pharmaceutiques.
 RÉGNIER, ☉ I..... Parasitologie.
 CHARONNAT, ☉ I..... Chimie et Pharmacie Chimique.
 JANOT..... Pharmacie galénique et biologie
 végétale.
 VALETTE, ☉ A..... Histoire naturelle.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DOMANGE... Travaux Pratiques de 1^{re} année. Chimie générale et
 pharmaceutique.
 GAUTHIER, ☉ A. — de 2^e et 3^e année. Chimie analytique.
 PARIS..... Micrographie.
 CORRIEZ..... Physique.
 N..... Microbiologie.
 GUILLOT... Travaux pratiques de 4^e année. Chimie biologique, Bromato-
 logie et Pharmacie chi-
 mique.

Bibliothécaire en Chef : M GARNIER, ☉ A.



A LA MÉMOIRE DU PROFESSEUR GRIMBERT

PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE A LA FACULTÉ
DE PHARMACIE DE PARIS,

PHARMACIEN EN CHEF HONORAIRE DES HOPITAUX DE PARIS,

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE,

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR.

Très respectueux hommage.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR HERISSEY

PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE A LA FACULTÉ
DE PHARMACIE DE PARIS,

PHARMACIEN HONORAIRE DES HOPITAUX DE PARIS.

OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR.

Hommage de respectueuse reconnaissance.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR R. FABRE

PROFESSEUR DE TOXICOLOGIE A LA FACULTÉ
DE PHARMACIE DE PARIS,

PHARMACIEN EN CHEF DES HOPITAUX DE PARIS.

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR.

Respectueux hommage de reconnaissance.

A MON MAITRE

M. P. FLEURY

MAITRE DE CONFÉRENCES A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
PHARMACIEN EN CHEF DES ASILES DE LA SEINE

*Qui nous proposa ce travail et qui, par ses conseils
éclairés et bienveillants, facilita notre tâche, nous
offrons avec nos sincères remerciements le faible
témoignage de notre bien vive reconnaissance.*

A MA FEMME

A MES PARENTS

A MES ENFANTS

A MES AMIS

INTRODUCTION.

A la suite de la découverte de la laccase de l'arbre à laque, G. BERTRAND fut amené à donner une théorie sur la constitution de cette diastase, théorie où le manganèse jouait un rôle capital.

Nous allons rappeler les faits essentiels qui ont servi à G. BERTRAND pour édifier sa théorie ainsi que les recherches subséquentes destinées soit à la confirmer, soit à l'infirmer.

Travaux de G. Bertrand.

C'est en 1894, que G. BERTRAND [14] découvrit la laccase dans le latex de l'arbre à laque en précipitant ce suc par l'alcool, procédé qui avait permis à PAYEN et PERSOZ en 1833 d'isoler la diastase du malt.

Après avoir mis en évidence les propriétés oxydasi-ques de la laccase et étudié son action sur divers composés organiques — études menées parallèlement à celles de BOURQUELOT [24] — G. BERTRAND montra, soit seul, soit en collaboration avec BOURQUELOT [25], que cette diastase oxydante était répandue chez tous les végétaux, même chez les végétaux inférieurs.

En 1897, G. BERTRAND [16] constata que les cendres du suc de l'arbre à laque étaient très riches en manganèse ; il mit ce métal en évidence par la réaction de HOPPE-SEYLER, c'est-à-dire oxydation du manganèse en acide permanganique sous l'action oxydante du bioxyde de plomb, en milieu nitrique.

Un gramme de laccase, extraite d'un échantillon de laque annamite, contenait :

Eau d'hydratation	0 g.,072
Cendres	0 g.,046
Manganèse	0 g.,00117

soit environ 2 g.,5 de Mn pour 100 g. de cendres.

Ayant soumis d'autre part une solution aqueuse de laccase à une précipitation fractionnée par l'alcool, G. BERTRAND constata que les différentes fractions ne possédaient pas la même activité oxydante : celle-ci variait dans le même sens que leur teneur en manganèse.

Voici à titre d'exemple, les résultats d'une expérience effectuée sur trois échantillons provenant d'une précipitation alcoolique fractionnée ; sur chaque échantillon, l'auteur a dosé le manganèse et il a déterminé le volume d'oxygène fixé en 1 heure et demi par 50 cm³ d'une solution d'hydroquinone à 2 p. 100 en présence de 0 g.,200 du produit sec.

Echantillon	Oxygène absorbé	Manganèse
	cm ³	p. 100
N ^o 1	19,1	0,159
N ^o 2	15,5	0,126
N ^o 3	10,6	0,098

En présence de ces résultats : forte teneur en manganèse des cendres du sucre de l'arbre à laque — proportionnalité entre la quantité de manganèse et l'activité de la laccase, — G. BERTRAND fut amené à penser qu'il y avait un rapport entre la présence du manganèse et l'activité oxydasique, et il chercha à vérifier expérimentalement cette hypothèse.

Après avoir essayé, sans succès, d'éliminer tout le manganèse de la laccase, opération analytique difficile à cette époque, il utilisa une méthode synthétique beaucoup plus

aisée [15] : ayant préparé du suc de Luzerne, pauvre en manganèse et peu actif, il lui ajouta de faibles quantités de manganèse et put constater une augmentation de l'activité oxydasique.

Voici comment G. BERTRAND préparait le suc de Luzerne et comment il conduisait ses expériences :

Plusieurs kilogs de Luzerne (*Medicago sativa* L.) au début de la floraison, étaient aussitôt broyés au mortier et soumis à la presse. Le jus obtenu, saturé de chloroforme, était abandonné à la coagulation dans l'obscurité ; après 24 heures, le suc était filtré puis additionné de deux volumes et demi d'alcool ; le précipité, égoutté, était repris par un peu d'eau ; il donnait un liquide limpide, jaune pâle, d'où un excès d'alcool (5 volumes) précipite des flocons presque blancs, faciles à recueillir, qui étaient séparés et desséchés rapidement dans le vide. Cet échantillon de laccase de Luzerne renfermait :

Eau dosée à 110°	12,4 p. 100
Matières organiques	42,4 p. 100
Cendres	45,2 p. 100

et une proportion de manganèse inférieure à 1 p. 50.000.

En dissolvant 0 g.,100 de laccase ainsi préparée dans 50 cm³ d'une solution d'hydroquinone, on observait simplement une couleur rouge, même après 24 heures d'agitation continue au contact de l'air.

An contraire, si l'on ajoutait à la même solution 1 mg. de manganèse, à l'état de sulfate, il suffisait de 2 heures, pour voir apparaître les premiers cristaux de quinhydrone.

Les résultats quantitatifs étaient les suivants [17] :

	Oxygène fixé
1° Manganèse seul (témoin).....	0 cm ³ ,3
2° Laccase de Luzerne seule	0 cm ³ ,2
3° Laccase de Luzerne et manganèse	6 cm ³ ,3

G. BERTRAND constata en outre que le manganèse ne paraissait pas être remplaçable par aucun autre métal,

même par le fer. Des essais furent effectués, en substituant au manganèse divers métaux tels que : Fe, Al, Cr, Zn, Cu, Ca, Mg, K, à la dose de 1 mg. de métal, introduit à l'état de sulfate ; en aucun cas le volume d'oxygène fixé ne dépassa quelques dixièmes de centimètres cubes.

THÉORIE DE G. BERTRAND [17]. — C'est en se basant sur les expériences précédentes et sur celles qu'il fit en collaboration avec MALLÈVRE [18] concernant le rôle du calcium dans l'action de la pectase, que G. BERTRAND crut pouvoir formuler une théorie sur la nature des diastases :

D'après lui une diastase doit être considérée comme un système composé de deux substances complémentaires l'une de l'autre :

L'une est de nature minérale (manganèse pour la laccase, calcium pour la pectase) et capable à elle seule de produire la transformation envisagée ; c'est la « complémentaire active » (ou co-diastase). L'autre est de nature organique et altérable par la chaleur ; elle augmente considérablement l'activité de la première ; c'est la « complémentaire activante ». C'est ce que l'on dénomme maintenant apo-diastase.

La partie organique de la diastase servirait en quelque sorte de support colloïdal au métal qui serait ainsi entièrement divisé et aurait une surface de contact considérable.

Dans le cas de la laccase, G. BERTRAND explique le rôle du manganèse par le pouvoir oxydant des sels manganoux : ceux-ci, en solution aqueuse, sont partiellement hydrolysés : ils fixent de l'eau et donnent un acide libre et de l'oxyde manganoux :

$\text{RMn} + \text{H}_2\text{O} = \text{RH}_2 + \text{OMn}$ (R = radical acide) ;
mais l'oxyde manganoux OMn s'oxyde spontanément en présence de l'air ; dans cette oxydation la molécule d'oxygène O_2 empruntée à l'air se trouve scindée en deux atomes : l'un est fixé sur l'oxyde manganoux :



L'autre atome d'oxygène ainsi libéré se porte sur le corps oxydable (hydroquinone, par exemple) ; enfin l'acide qui provient de l'hydrolyse réagit sur le bioxyde de manganèse formé :



Il y a libération d'un nouvel atome d'oxygène actif qui se fixe sur une nouvelle quantité du corps oxydable ; et, comme le sel manganoux primitif est régénéré, les mêmes réactions recommencent et se poursuivent ; dans ce cycle de réactions, le manganèse du sel manganoux n'a d'autre rôle que de transformer l'oxygène moléculaire en oxygène atomique beaucoup plus actif ; mais le pouvoir oxydant du sel manganoux varie beaucoup avec la nature de l'acide qu'il contient ; il est d'autant plus élevé que le sel est plus hydrolysable ou — ce qui revient au même — que l'acide est plus faible.

Partant de ces données, G. BERTRAND considère les oxydases comme des combinaisons spéciales du manganèse dans lesquelles le radical acide, probablement de nature protéique, et variable suivant le ferment considéré, aurait juste l'affinité nécessaire pour maintenir le métal sous la forme la plus propice au rôle qu'il doit remplir.

Le manganèse serait donc le véritable élément actif de de l'oxydase, celui qui fonctionne comme activateur et convoyeur d'oxygène.

La matière organique, de son côté, en dehors du rôle qu'elle joue comme substance activante, apporterait à la diastase tous les autres caractères physiques et chimiques, composition élémentaire, comportement vis-à-vis des réactifs (alcools, sels) et des agents physiques (chaleur).

A. Travaux en accord avec la théorie de G. Bertrand.

1. TRAVAUX DE TRILLAT. — En 1904, TRILLAT [103] publia toute une série de travaux sur les réactions oxydantes du manganèse, après avoir montré que ce métal possédait un certain pouvoir oxydant dans des milieux d'alcalinité déterminée. Cet auteur pensa trouver un complexe se rapprochant de la laccase de G. BERTRAND, dans le système « manganèse-matière protéique » en milieu alcalin ; il effectuait ainsi le premier essai de préparation de laccases synthétiques.

La présence d'albumine, de gélatine ou de certains autres colloïdes non azotés (gomme arabique, dextrine) dans des solutions de sels manganeux empêche leur précipitation par alcalinisation et l'action oxydante du manganèse est favorisée par la présence du colloïde.

TRILLAT considère ces associations comme de véritables oxydases. Elles jouissent en effet de propriétés analogues à celles des solutions oxydasiques naturelles, elles brunissent à l'air, donnent les réactions des oxydases, transforment le pyrogallol en purpurogalline, sont précipitées par l'alcool ; enfin la chaleur détruit leurs propriétés oxydasiques.

Pour TRILLAT ces expériences constituent une confirmation de la théorie de G. BERTRAND.

A la même époque A. et L. LUMIÈRE et CHEVROTIER [73] ont également préparé des oxydases artificielles par mélange de permanganate de potassium et de gomme arabique.

II. TRAVAUX DE L. HUGOUNENCQ et I. LOISELEUR [61]. —

Ces deux auteurs ont effectué des travaux qui semblent également confirmer la théorie de G. BERTRAND ; ils ont préparé une oxydase synthétique de grande activité : le « glycogène manganique ».

Si l'on ajoute une solution de chlorure manganoux à une pseudo-solution de glycogène pur, le cation se fixe

électivement sur la micelle ; si l'on alcalinise, l'hydrate manganeux reste fixé sur la micelle. Le colloïde obtenu est précipité par l'alcool, repris par l'eau et dialysé, précipité à nouveau par l'alcool et desséché dans le vide.

Le « glycogène manganique » ainsi obtenu fournit une solution légèrement jaune, brunissant à l'air, il est doué d'un pouvoir oxydant très marqué et permet de reproduire les actions oxydasiques naturelles avec leur intensité et parfois leurs modalités.

HUGOUNENCQ et LOISELEUR ont étudié l'action de ce glycogène manganique sur la benzidine, sur des phénols (en particulier le gaïacol) ; sur l'aldéhyde salicylique et l'alcool benzylique ; ils ont pu mettre en évidence une certaine proportionnalité entre l'action oxydante du glycogène manganique et sa teneur en manganèse.

A côté des travaux précédents où le manganèse est considéré comme l'élément actif, un certain nombre d'autres publications ont attiré l'attention sur le rôle important que peut jouer le fer dans l'action des oxydases.

Ces travaux ne sont pas en contradiction avec la théorie de G. BERTRAND si l'on admet que celle-ci reste valable lorsqu'on remplace le manganèse par le fer.

RÔLE DU FER DANS L'ACTION DES OXYDASES.

C'est d'abord SPITZER [95] qui, en étudiant la part prise par certains nucléo-protéides au pouvoir oxydant de la cellule, signale le rôle actif que peut jouer le fer. LEPINOIS [72] ensuite, en étudiant les ferments oxydants dans l'Aconit et la Belladone, signale la présence du fer et quelquefois de traces de manganèse. L'auteur a dosé ces deux métaux dans les feuilles d'Aconit et de Belladone et obtenu les résultats suivants :

	Cendres p. 100	Mn p. 100 de cendres	Fe p. 100 de cendres
Feuilles d'Aconit	33,7	traces	0,127
Feuilles de Belladone	31,36	0,127	0,130

LÉPINOIS [72] signale que le manganèse peut être quelquefois absent, l'oxydase conservant néanmoins une certaine activité.

D'après les résultats obtenus par VADAM [104], l'oxydase de l'Hellébore fétide renferme du fer, mais pas de manganèse.

I. TRAVAUX DE SARTHOU. — En 1900, M. J. SARTHOU [91] signale, dans le latex du faux Poivrier (*Schinus molle* ; Térébinthacées) la présence d'une oxydase qui possède toutes les propriétés de la laccase de G. BERTRAND et lui donne le nom de *schinoxydase*. Les cendres de cette oxydase, obtenue par précipitation alcoolique du latex, renferment du fer (1 à 3 g. pour 100 g. de cendres), du calcium, du sodium, mais pas de manganèse.

Comme G. BERTRAND, SARTHOU constata une certaine proportionnalité entre l'activité de l'oxydase et sa teneur en métal (en fer dans le cas présent).

Nous rapportons textuellement ses conclusions :

« 1° Le fer joue dans la schinoxydase, le même rôle que le manganèse dans la laccase de G. BERTRAND ».

« 2° Le fer à l'état ferreux jouit de la propriété de céder à certains corps oxydables une partie de l'oxygène qu'il emprunte à l'air ».

« 3° Le fer en combinaison organique avec C et H possède très peu cette propriété ».

« 4° Le fer en combinaison organique avec N et CN jouit de cette propriété au plus haut degré ».

« 5° Pour une même quantité de fer, les quantités d'oxygène transmis varient suivant l'état de combinaison de ce fer ».

En somme, d'après cet auteur il faut admettre qu'à côté de la « combinaison mangano-organique » de G. BERTRAND, il existe une « combinaison ferro-organique », également susceptible de constituer une oxydase ; d'où deux sortes d'oxydases : les unes à base de manganèse

(type laccase) les autres à base de fer (type schinoxydase).

II. TRAVAUX DE J. WOLFF. — J. WOLFF [122], enfin, a montré que certaines combinaisons du fer et particulièrement le ferrocyanure de fer colloïdal pouvaient jouer le rôle de peroxydiastases dont elles possèdent les propriétés essentielles ; pour lui, comme pour SARTHOU, ce sont les combinaisons avec le groupement CN qui sont les plus actives. J. WOLFF a pu reproduire des phénomènes oxydasiques par l'action combinée du ferrocyanure de fer et des alcalis ou des sels alcalins facilement hydrolysables. Il a constaté de plus, certaines analogies entre les oxydases naturelles et les oxydases artificielles quant à leur activation par les sels.

B. Travaux en désaccord avec la théorie de G. Bertrand.

I. TRAVAUX DE SLOWTZOFF. — En 1900 [94], cet auteur, à l'occasion d'une étude cinétique des oxydases de la Pomme de terre et du Chou, analyse les cendres de ses préparations diastasiques ; il ne trouve pas de phosphore, ni de manganèse, et à peine des traces de fer. Pour cet auteur la théorie de G. BERTRAND serait fondée sur des analogies plutôt que sur des vérifications expérimentales.

II. TRAVAUX DE ISSAYEW (1905) [63]. — A des préparations d'oxydase de malt, ISSAYEW ajoute du sulfate de manganèse en proportions variables et constate que l'activité de l'oxydase n'est pas augmentée ; les faibles concentrations de manganèse n'ont pas d'action sensible ; les concentrations élevées affaiblissent considérablement l'action de l'oxydase.

III. TRAVAUX DE DONNY HÉNAULT [55]. — Donny HÉNAULT (1905) attribue au manganèse un rôle spécial dans les oxydations, mais nie l'existence de l'oxydase elle-

même ; pour lui, la laccase ne doit son rôle catalytique qu'au manganèse ; l'intervention de la complémentaire organique de G. BERTRAND n'a jamais été démontrée ; tout le phénomène se réduit à l'action du sel manganeux en milieu d'alcalinité légère, produite par la dissociation des sels employés (citrate trisodique par exemple). Donny HÉNAULT prépare des laccases synthétiques renfermant du manganèse, les unes à base de gomme arabique, les autres à base de dextrine ; il alcalinise ses préparations par addition de faibles quantités de carbonate de sodium et, après une double précipitation par l'alcool, il obtient des produits dont l'activité est du même ordre de grandeur que celle de la laccase de G. BERTRAND.

En conclusion, dit Donny HÉNAULT « la laccase de G. BERTRAND n'est pas plus naturelle que la nôtre, et l'hypothèse qui en fait une diastase oxydante est ainsi démontrée fausse ». La laccase de G. BERTRAND serait ainsi une création artificielle engendrée par la précipitation alcoolique.

IV. TRAVAUX DE A. BACH [3]. — En soumettant un mélange de suc de champignons (*lactarius Vellereus* et *Russula Delica*) à des précipitations fractionnées par l'alcool à différents titres, BACH a obtenu des oxydases ne renfermant ni fer, ni manganèse et cependant très actives ; elles oxydaient rapidement la tyrosine, le pyrogallol, et, — plus lentement — l'hydroquinone. La température de 80° détruisait totalement l'oxydase.

Pour l'auteur la présence du manganèse ou du fer n'est nullement indispensable à l'accomplissement des réactions oxydasiques.

V. TRAVAUX DE VAN DER HAAR [106]. — Van der HAAR a étudié le rôle que joue le manganèse dans la peroxydase des feuilles de Lierre (*Hedera helix*) et celles des Pommes de terre (*Solanum tuberosum*), en partant des feuilles de Lierre, il obtint une peroxydase très pure, qu'il caracté-

risa comme un gluco-protéide renfermant 0 g.,00023 de manganèse pour 100 g. de cendres. La peroxydase de Pomme de terre — également de nature gluco-protéidique — renfermait 0 g.,0003 de manganèse pour 100 g. de cendres ; VAN DER HAAR s'étonne que de nombreux auteurs signalent des oxydases « exemptes de manganèse » sans indiquer les méthodes utilisées pour la recherche de ce métal, ni leur sensibilité.

Convaincu qu'il ne pouvait éliminer le manganèse même par des méthodes de purification très soignées, l'auteur a essayé de résoudre le problème d'une autre façon.

Il fit germer, dans des solutions salines exemptes de manganèse, des graines de *Hedera helix* qu'il avait auparavant analysées : elles renfermaient en moyenne 1/100 de mg. de manganèse par graine.

Après une période de développement de 16 mois, VAN DER HAAR obtint des plantes bien développées, deux d'entre elles pesant respectivement 12 g.,5 et 13 g.,5, hachées et traitées par l'alcool, fournirent une peroxydase active, (production de 68 milligrammes de purpurogalline en 24 heures en présence de pyrogallol et d'eau oxygénée) ; cependant la teneur en manganèse de chaque plante n'était que de 1/200 de mg. environ. De ces expériences, l'auteur tire des conclusions défavorables à la théorie de G. BERTRAND, au moins en ce qui concerne l'oxydase d'*Hedera helix*.

VI. TRAVAUX DE SUMINOKURA [99]. — Etudiant les sucs de laque du Japon, SUMINOKURA constate la présence du manganèse dans leurs cendres ; à des laccases purifiées par précipitations alcooliques il ajoute des quantités déterminées de manganèse, sous forme de sulfate, chlorure, hypophosphite et constate que l'activité oxydasique n'est pas augmentée. Il en conclut que celle-ci ne serait donc pas due au manganèse.

On voit, d'après ce bref exposé, que les nombreux auteurs qui ont étudié les diastases oxydantes sont bien

loin d'être d'accord sur le rôle que peuvent jouer le manganèse et le fer dans l'action oxydasique. Nous pouvons grouper leurs travaux de la façon suivante :

1° Ceux de G. BERTRAND, TRILLAT, HUGOUNENCQ et LOISELEUR, pour qui le manganèse joue un rôle capital dans l'action des oxydases.

2° Ceux de SARTHOU, WOLFF, qui ont attiré l'attention sur le rôle que peut jouer le fer dans les mêmes conditions.

3° Ceux de BACH, ISSAYEW, VAN DER HAAR, qui ont préparé ou isolé des oxydases plus ou moins dépourvues de manganèse et de fer.

Nous laissons volontairement de côté les travaux de Donny HÉNAULT aussi intéressants qu'ils puissent être : l'auteur nie la nature diastasique de la laccase ; la critique de cette opinion (énergiquement combattue par EULER et BOLIN) sort du cadre de notre travail. Entre les deux premiers groupes de travaux — ceux qui attribuent le rôle fondamental au manganèse et ceux qui l'attribuent au fer — la contradiction n'est pas bien grande ; elle se ramène à une question de spécificité du métal ; la théorie de G. BERTRAND qui met en relief le rôle du manganèse peut s'accorder avec la théorie de WARBURG pour qui le fer joue un rôle essentiel.

Toutefois dans les données qui plaident en faveur de la théorie de G. BERTRAND, une discrimination nous paraît nécessaire : les travaux de TRILLAT, WOLFF, HUGOUNENCQ et LOISELEUR, malgré leur valeur, ne sont pas à l'abri de critiques importantes ; ces auteurs ont réalisé des « oxydases synthétiques » qui sont des systèmes oxydants peu actifs par rapport à la laccase que nous avons eue à notre disposition. Il semble difficile d'assimiler de tels systèmes à des préparations diastasiques.

En dernière analyse, il nous semble légitime de retenir exclusivement d'une part les travaux de G. BERTRAND et sa théorie, d'autre part les travaux de BACH, ISSAYEW, VAN DER HAAR et SUMINOKURA, dont les conclusions sont

en désaccord avec l'hypothèse de l'intervention d'un métal (manganèse ou fer) dans l'action oxydasique ; nous allons examiner maintenant les critiques qui ont été adressées à ces divers travaux.

Critiques adressées à la théorie de G. Bertrand.

L'hypothèse émise et soutenue par G. BERTRAND a été accueillie avec quelque réserve surtout à l'étranger. OPPENHEIMER [87] fait remarquer qu'il semble prématuré de construire une théorie concernant le mécanisme des actions diastasiques ; d'après lui, la théorie de G. BERTRAND souffre du fait qu'elle met d'une façon trop exclusive, le manganèse au premier plan.

Pour WARBURG le rôle de ce métal serait très limité : en effet son action est faible et il manque souvent. En dehors des objections formulées contre la théorie de G. BERTRAND quelques expériences que cet auteur a effectuées pour appuyer son hypothèse sur le rôle du manganèse ont été l'objet de certaines critiques, en particulier la plus importante, celle qui a servi de base à la théorie, l'expérience de l'activation, par addition de manganèse, du suc de Luzerne inactif. Cette expérience a été reprise et étudiée par EULER et BOLIN [38] ; ces auteurs ont constaté que la partie active de la laccase de Luzerne (type *medicago*) est constituée par des sels de sodium et de calcium d'acides organiques : citrique, malique, mésoxalique, gluconique. Ils ont étudié la vitesse d'oxydation de l'hydroquinone en solution neutre, en présence de quantités variables de sels de manganèse et de sodium. En comparant les résultats ainsi obtenus avec ceux que fournit la laccase de Luzerne, ils sont arrivés aux conclusions suivantes :

1° L'action de la laccase n'est pas due à la réaction alcaline du milieu (contrairement aux données de Donny HÉNAULT).

2° La laccase examinée ne perd pas son activité par

ébullition ; elle est — ou elle renferme — un catalyseur mais pas un corps qu'on puisse appeler enzyme :

3° La laccase de Luzerne contient d'assez grandes quantités de sels d'acides organiques, et un certain nombre de sels de sodium de ces mêmes acides, qui activent l'oxydation de l'hydroquinone.

Le suc de Luzerne, préparé selon la technique de G. BERTRAND, fournit à la calcination une proportion élevée de cendres (45,2 p. 100), qui proviennent d'une part de sels minéraux, d'autre part de sels d'acides organiques ; ces derniers constituent une grande partie de la matière organique du suc (42,4 p. 100).

Lorsque G. BERTRAND ajoute du manganèse à son suc de Luzerne, l'absorption d'oxygène n'est-elle pas attribuable à l'intervention de ces sels d'acides organiques, catalysée par le manganèse ? G. BERTRAND [19] n'a-t-il pas démontré par ailleurs que l'activité du manganèse est d'autant plus marquée que l'acide auquel il est combiné est plus faible ?

Enfin, d'après BAYLISS [9], il aurait été désirable d'établir que la laccase perdait son activité lorsqu'on la privait de son manganèse.

Critique des travaux défavorables à la théorie de G. Bertrand.

Les travaux qui sont en désaccord avec la théorie de G. BERTRAND ne sont pas non plus à l'abri de toute critique. Le fait de trouver des oxydases sans manganèse n'est pas suffisant pour faire rejeter cette théorie, surtout lorsque le procédé analytique employé pour la recherche du métal n'est pas soigneusement précisé.

Le travail le plus intéressant semble être celui de VAN DER HAAR qui, par une méthode originale, essaya d'obtenir une diastase dépourvue de manganèse ; mais en ce qui concerne la théorie de G. BERTRAND la portée du travail de VAN DER HAAR est diminuée par le fait que

l'auteur a étudié une peroxydase et non une oxydase ; il a d'autre part, négligé d'examiner le rôle du fer.

Au cours de ces dernières années on a en effet admis que le groupe actif des peroxydases était la protohématine. WILLSTÄTTER et ses élèves ont obtenu des préparations très actives de peroxydase du raifort ou du navet. Ces préparations de couleur rouge contiennent une certaine quantité de fer. Par la suite KUHN, HAND et FLORKIN [70] obtinrent une préparation très pure de peroxydase du raifort contenant une ferroporphyrine qu'ils considèrent comme constituant le groupement actif de la peroxydase. Ces résultats furent controversés par ELLIOT et KEILIN [36] qui prétendirent que toute l'hémine du raifort et de sa peroxydase purifiée était à l'état libre et non reliée à un support colloïdal. Cependant en 1936, TAMAI [99 bis] a montré que le fer de la peroxydase purifiée de pomme de terre n'était pas ionisable. SUMNER et HOWELL [98 bis] ont obtenu une peroxydase très active à partir du latex de figuier, peroxydase qui renferme de l'hématine combinée. Enfin ITOH [63 bis] a montré que la peroxydase purifiée du raifort possédait le spectre ultraviolet d'un chromoprotéide hématinique avec les bandes d'absorption caractéristiques de la porphyrine et du protéide. La peroxydase apparaît donc comme une ferroporphyrine liée à un support colloïdal.

Par contre aucun des travaux destinés à contrôler la théorie de G. BERTRAND n'a permis jusqu'à présent d'énoncer un jugement définitif sur le rôle que peut jouer le manganèse dans l'action oxydasique. La diversité et l'incertitude des résultats communiqués par de nombreux auteurs sont liées en grande partie à des difficultés analytiques : des traces d'un élément (manganèse, fer, etc...) peuvent être responsables de l'activité d'une préparation diastasique ; il est alors extrêmement difficile d'affirmer la présence ou l'absence de l'élément en question sans une sérieuse étude préalable des mé-

thodes analytiques utilisées, de leur fidélité, de leur sensibilité.

Malgré les critiques qui ont été formulées à l'égard de certaines de ses expériences et de sa théorie, G. BERTRAND conserve le mérite d'avoir, pour la première fois, attiré l'attention des chercheurs sur l'importance des substances minérales dans les réactions diastasiques, et d'une façon plus générale, sur le rôle des « infiniments petits chimiques » dans les phénomènes biologiques.

L'intérêt de ces notions est aujourd'hui universellement reconnu.

Aussi nous a-t-il semblé utile d'étudier à nouveau la laccase, de ce même point de vue, en évitant les erreurs de méthode que nous venons de signaler.

Nous nous sommes proposé un double but :

1° Appliquer les techniques modernes à la purification de la laccase.

2° Suivre au cours de ces purifications, effectuées par des voies différentes, le sort des éléments minéraux et en particulier, celui du fer et du manganèse, en utilisant des méthodes analytiques soumises au préalable à une étude très soignée.

Notre travail est divisé en trois parties :

1° Etude des différentes techniques utilisées.

a) Mesure de l'activité de la laccase.

b) Etudes des techniques de dosage du fer et du manganèse ; application à l'examen du suc d'arbre à laque.

2° Etude des diverses méthodes de purification de la laccase.

3° Purification de la laccase par des méthodes associées.

Ce travail a été effectué au laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Pharmacie de Paris ; commencé sous la direction du regretté Professeur L. GRIMBERT, il fut continué sous la bienveillante surveillance du Professeur HÉRISSEY, à qui nous adressons nos hommages

respectueux ; le sujet a été inspiré par notre maître P. FLEURY que nous tenons à assurer de notre gratitude.

Nos remerciements les plus sincères vont également à M. POIROT, pharmacien des Hôpitaux de Paris, qui ne nous a pas ménagé ses précieux conseils et ses justes critiques. Que mes amis J. COURTOIS, pharmacien des hôpitaux de Paris et R. POTTIER, trouvent ici toute ma sympathie pour l'aide efficace qu'ils m'ont apporté dans la rédaction de ce travail.

PREMIÈRE PARTIE.

Techniques utilisées.

Au cours de notre travail nous avons été amené à effectuer les déterminations suivantes :

- 1° Mesure de l'activité de la laccase ;
- 2° Dosage de l'azote ;
- 3° Dosage du fer ;
- 4° Dosage du manganèse.

Nous n'avons utilisé que des techniques éprouvées par un long usage ; lorsqu'une modification a été nécessaire nous avons vérifié sa validité avant toute application.

1° Pour mesurer l'activité de la laccase, nous avons utilisé la technique de P. FLEURY ; nous avons pour cela de bonnes raisons : la sécurité même de la méthode et la possibilité de profiter des conseils judicieux de son auteur.

2° Nous avons employé pour le dosage de l'azote, la méthode classique de KJELDAHL.

3° et 4° En ce qui concerne le dosage du fer et du manganèse nous avons été obligé d'adapter certaines techniques connues aux exigences de notre travail. Cette mise au point a fait l'objet d'une étude particulière qui constituera le chapitre principal de cette première partie. Le fer et le manganèse sont universellement répandus dans la nature ; tous les organismes vivants, végétaux ou animaux les renferment dans des proportions variables, mais toujours très faibles, oscillant entre quelques cen-

tièmes et quelques millièmes de milligramme pour cent grammes de tissu frais.

Pour effectuer leur dosage, le biochimiste, toujours limité dans ses prises d'essai, est obligé de recourir à des méthodes qui rentrent dans le cadre de la microanalyse. Heureusement le fer et le manganèse possèdent des réactions colorées extrêmement sensibles et quantitatives qui se prêtent à des microdosages simples et rapides.

Par la nature même de notre travail, nous avons été amené à doser des quantités de fer et de manganèse aussi faibles que possible, au voisinage des limites de sensibilité des réactions employées, soit pour le fer $\frac{2}{100}$ de mg. [20] ; et pour le manganèse $\frac{1}{1000}$ de mg. [1].

CHAPITRE I.

Mesure de l'activité de la laccase.

Rappelons que la laccase est une phénolase, c'est-à-dire une diastase qui favorise l'oxydation de dérivés phénoliques aux dépens de l'oxygène de l'air, réaction qui se manifeste par l'apparition d'une coloration ou d'un précipité.

Pour établir une méthode de mesure de l'activité de la laccase à la fois simple et rapide, il est tout indiqué de s'adresser aux réactions de coloration comme l'ont fait récemment FLEURY [46] et SUMINOKURA [99]. Mais, en dépit de sa simplicité apparente, cette détermination nécessite quelques explications préliminaires.

La mesure de l'activité d'une diastase est en somme une mesure de vitesse de réaction, c'est-à-dire une mesure de la quantité de matière transformée en fonction du temps.

Toutes les méthodes employées se déduisent facilement de l'équation suivante qui, en première approximation permet de représenter l'activité d'une diastase :

$$A = \frac{Q}{Dt}$$

A = activité

Q = quantité de matière transformée

t = Temps

D = quantité de préparation diastasique.

(la température et la réaction du milieu sont supposées constantes).

On voit sur l'équation que si l'on maintient constants

deux quelconques des facteurs du deuxième membre, l'activité variera en fonction du troisième facteur qui pourra ainsi servir de mesure de l'activité diastasique.

La formule précédente contient deux hypothèses :

1° Pour une quantité D constante de diastase, il y a proportionnalité entre le temps et la quantité de matière transformée.

2° Pour un temps t constant, il y a proportionnalité entre la quantité de diastase et la quantité de matière transformée.

Dans le premier cas (D constant), pour que la quantité de matière transformée soit proportionnelle au temps il faut que cette quantité Q reste petite par rapport à celle du substrat mis en œuvre ; en pratique, elle ne doit pas dépasser notablement 10 à 15 pour 100 du substrat (méthode dite des vitesses initiales).

Dans le deuxième cas (t constant) pour que la quantité de substance transformée soit proportionnelle à la quantité de diastase, il faut que le rapport entre les concentrations du substrat et de la diastase demeure entre certaines limites qu'il est possible de déterminer expérimentalement.

Enfin il faut tenir compte de l'influence des matières étrangères apportées par la préparation diastasique dont on veut mesurer l'activité.

Il peut arriver en effet que, même dans le cas où les conditions ci-dessus énoncées sont remplies, la loi de proportionnalité ne se vérifie pas, car lorsqu'on compare deux préparations diastasiques, on fait en réalité varier deux facteurs : la quantité de diastase et la quantité d'impuretés qui l'accompagnent inévitablement. Ces impuretés peuvent jouer un rôle important dans l'activité de la diastase, soit en la diminuant, soit, plus rarement, en l'augmentant. On peut d'ailleurs avoir une idée de cette influence en étudiant les variations d'activité de la diastase en présence d'une certaine quantité de solution diastasique inactivée par la chaleur.

Mesure de l'activité de la laccase.

Méthode de P. Fleury.

P. FLEURY, au cours de ses recherches sur la laccase [46], a mis au point une méthode colorimétrique de mesure de l'activité de cette diastase ; le principe de cette méthode est le suivant :

La laccase provoque l'oxydation, aux dépens de l'oxygène de l'air, du gaïacol en tétragaïaquinone dont la coloration rouge se prête à une mesure colorimétrique.

Quand la réaction est effectuée dans des conditions bien déterminées, indiquées par l'auteur, elle est suffisamment régulière pour servir de base à un dosage ; la tétragaïaquinone formée est extraite par le chloroforme ; la coloration de la solution chloroformique est comparée à celle d'une solution centinormale d'iode prise comme étalon ; P. FLEURY a montré qu'une solution chloroformique à 46 mg.,5 de tétragaïaquinone par litre, obtenue par extraction directe de la solution aqueuse après action de la laccase sur le gaïacol présente la même teinte qu'une solution centinormale d'iode (examinée sous une épaisseur de 10 mm. au colorimètre DUBOSQ).

Conditions du dosage.

Température : 30° (thermostat).

PH optimum : 6,7 (obtenu au moyen de solutions tampons de phosphates).

Durée d'oxydation : 10 minutes.

P. FLEURY a déterminé expérimentalement la valeur du rapport $\frac{\text{substrat}}{\text{diastase}} = \frac{\text{gaïacol}}{\text{laccase}}$ qu'il convient de ne pas dépasser ; il opère sur 10 cm³ d'une solution de gaïacol à 1 p. 100 ; dans ces conditions la quantité de diastase mise en œuvre doit être telle que, après oxydation de la solution de gaïacol dans les conditions énumérées, la

quantité de tétragaïaquinone formée ne dépasse pas 10 mg., soit 10 p. 100 du gaïacol.

RÉACTIFS.

1° *Solution aqueuse de gaïacol.* — Nous employons le gaïacol cristallisé Poulenc P. F. = 28° à 29°, en solution aqueuse à 2 p. 100 ; cette solution est obtenue en introduisant le gaïacol dans la totalité de l'eau portée à la température de 70° à 80°, et agitant jusqu'à dissolution complète ; la solution est légèrement sursaturée mais ne cristallise pas dans les conditions habituelles.

2° *Eau distillée.* — Nous utilisons de l'eau distillée dans un appareil en verre neutre, conservée dans des flacons en verre neutre et bouillie avant usage pour chasser le gaz carbonique. Son pH oscille entre 6,5 et 6,7.

3° *Solution type d'iode.* — La solution centinormale d'iode est obtenue par dilution au dixième d'une solution décinormale ; on assure sa stabilité par addition d'iodure (2,5 p. 100 de IK).

4° *Solutions de phosphates.* — Les solutions tampons nécessaire pour amener le liquide en réaction au pH optimum, sont obtenues par mélange des deux solutions suivantes :

Solution 0,0665 M de phosphate monopotassique (PO_4KH_2).

Solution 0,0665 M de phosphate disodique ($\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$, 12 H_2O).

Le volume de solution tampon employée est de 4 cm^3 pour un volume total de 10 cm^3 .

MODE OPÉRATOIRE.

a) *Obtention du pH 6,7.* — L'ajustage du mélange réactionnel au pH 6,7 est réalisé par tâtonnements ; dans un tube à essais on mesure 5 cm^3 de la solution de gaïacol à 2 p. 100 ; on ajoute :

1° des quantités mesurées des solutions de phosphates

disodique et monopotassique de telle sorte que le volume de leur mélange soit de 4 cm³.

2° La solution diastasique (0 cm³,1 à 0 cm³,4) préalablement inactivée par la chaleur.

3° de l'eau distillée pour faire un volume de 10 cm³.

Le pH du mélange obtenu est mesuré colorimétriquement à l'aide du bleu de bromothymol.

En faisant varier les proportions relatives des phosphates, on arrive à obtenir le pH optimum 6,7.

b) *Oxydation du gaïacol*. — Toutes nos expériences ont été effectuées à l'aide du tube spécial décrit par P. FLEURY (Recherches sur la laccase : p. 35) ; la capacité totale de cet appareil est de 25 à 30 cm³.

On y introduit 5 cm³ de la solution de gaïacol à 2 p. 100, 4 cm³ du mélange tampon de phosphates choisi comme il vient d'être indiqué, et on complète le volume à 10 cm³ avec de l'eau distillée.

Le tube est placé au thermostat réglé à 30°. On y fait passer un courant d'air à la vitesse de 15 à 20 litres à l'heure. Quand l'équilibre de température est établi, soit au bout de 3 minutes environ, on soulève le bouchon de l'appareil et on y introduit, au moyen d'une pipette la solution diastasique exactement mesurée. On ajuste de nouveau le bouchon ; au bout de 10 minutes on introduit d'un seul coup dans l'appareil 10 cm³ de chloroforme. On agite, après avoir fermé les orifices de l'appareil ; le chloroforme s'empare de la totalité de la tétragaïaquinone. On prélève avec une pipette à travers la couche aqueuse la solution chloroformique de tétragaïaquinone qui sera diluée s'il en est besoin, pour la mesure colorimétrique.

L'examen au colorimètre est effectué immédiatement la solution type d'iode N/100 étant toujours vue sous une épaisseur de 10 mm. On prend la moyenne de 4 mesures.

Soit H' la hauteur lue en millimètres.

c) *Calcul.* — Premier cas : La solution chloroformique d'extraction n'a pas été diluée.

Soit C la concentration en gaïacoquinone correspondant à la solution type observée sous la hauteur H , C' la concentration cherchée. Si, pour avoir l'égalité de teinte, il a fallu observer la solution chloroformique de tétra-gaïacoquinone sous la hauteur H' , on peut écrire la relation fondamentale de la colorimétrie :

$$\frac{C'}{C} = \frac{H}{H'} \qquad C' = \frac{C \times H}{H'}$$

Valeur de H . — Cette valeur est toujours 10 puisque nous observons toujours la solution d'iode sous 10 mm.

Valeur de C . — La solution centinormale d'iode correspond à une solution de gaïacoquinone à 46 mg.,5 pour 1.000 cm³. Comme nous cherchons à connaître la quantité de gaïacoquinone contenue dans 10 cm³ de chloroforme, nous devons donner à C la valeur $C = 0 \text{ mg.,465}$.

L'équation ci-dessus devient alors :

$$C' = \frac{0 \text{ mg.,465} \times 10}{H'} = \frac{4,65}{H'} \text{ mg.}$$

Deuxième cas : La solution chloroformique d'extraction a été diluée avant la mesure.

Soit $\frac{1}{n}$ la dilution (mélange de 1 volume de la solution chloroformique extractive avec $(n-1)$ volumes de chloroforme).

L'équation devient :

$$C' = \frac{4,65 \times n}{H'} \text{ mg.}$$

CHAPITRE II.

Dosage du fer.

Nous avons utilisé deux méthodes de dosage du fer : l'une volumétrique, la méthode molybdomanganométrique de FONTÈS et THIVOLLE [48] modifiée par P. FLEURY et MARQUE [47] l'autre, colorimétrique, est une modification et un perfectionnement de la méthode de LAPICQUE.

Ces deux méthodes se complètent l'une l'autre ; elles nous permettent de doser des quantités de fer allant de 2 mg. à 0 mg.,5 (méthode de FONTÈS et THIVOLLE) et de 0 mg.,5 à 0 mg.,02 (méthode de LAPICQUE modifiée). Cette dernière, surtout, nous a été d'un grand secours car nous devions le plus souvent doser des quantités de fer extrêmement faibles. Nous n'avons utilisé la méthode volumétrique que pour des sucs riches en fer (ordre de 1 g. par litre) ou comme contrôle de la méthode colorimétrique. Nous croyons inutile de décrire la méthode bien connue de FONTÈS et THIVOLLE, modifiée par P. FLEURY et MARQUE.

Méthode colorimétrique.

La méthode colorimétrique que nous allons utilisée est celle de LAPICQUE, basée sur la coloration rouge sang que donne le fer à l'état d'ion trivalent Fe^{III} avec un sulfocyanate alcalin (potassium ou ammonium).

Cette méthode est décrite dans les traités classiques ; elle a donné lieu à un grand nombre de recherches dont un exposé, même réduit, sort du cadre de notre travail,

Pour notre part, nous avons cru devoir en faire une étude particulière en raison des nombreux facteurs qui interviennent dans la réaction : nous redoutions en particulier l'influence perturbatrice de certains éléments qui accompagnent le fer dans les cendres. Nous croyons devoir rapporter ici un certain nombre de nos essais qui permettent de préciser ou de compléter des observations antérieures.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE. CONDITIONS DE SON EMPLOI.

1° La réaction du fer à l'état d'ion trivalent Fe^{III} avec le sulfocyanate de potassium est une réaction réversible ; on admet généralement que la coloration rouge sang est dûe aux molécules de sulfocyanate ferrique $(\text{SCN})_3 \text{Fe}$ non dissociées.

Pour que la réaction soit quantitative il faut donc déplacer l'équilibre dans le sens de la formation du sulfocyanate ferrique et par conséquent, d'après la loi d'action de masse, utiliser un grand excès de sulfocyanate alcalin par rapport à la quantité de fer à doser. Dans nos essais, la quantité de sulfocyanate est de 50 à 5.000 fois plus grande que celle du fer entrant en réaction.

2° L'expérience montre qu'un certain nombre d'acides (phosphorique, acétique, tartrique) atténuent et même peuvent faire disparaître la coloration, qu'ils soient à l'état libre ou à l'état de sel neutre.

Pour remédier à cet inconvénient, particulièrement grave, étant donné la présence de phosphate dans les cendres de nos sucres, il est nécessaire d'acidifier fortement le milieu réactionnel par l'acide chlorhydrique, qui, loin d'être nuisible, renforce plutôt la coloration. Par contre, nous avons vérifié que la présence de différents cations (Ca, Al, Cu, Mn, etc.), à la concentration de quelques millièmes de mg. dans le milieu n'avait aucune influence sur l'intensité de la coloration. Bref, d'après nos recherches, pour obtenir une réaction quantitative, il faut opé-

rer en milieu fortement chlorhydrique et utiliser un grand excès de sulfocyanate alcalin.

Sensibilité de la réaction. — Réalisée dans les conditions énoncées ci-dessus, la réaction est extrêmement sensible ; elle permet de mettre en évidence des traces de fer, de l'ordre du millième de milligramme dans un volume de 10 cm³. Mais le dosage de quantités de fer de cet ordre de grandeur est hérissé de difficultés qui tiennent en particulier aux impuretés des réactifs utilisés : c'est ainsi que l'acide chlorhydrique dit « pur pour analyse » renferme toujours une quantité de fer de l'ordre de 1 mg. par litre.

Comparaisons colorimétriques. — Nous utilisons le colorimètre classique de DUBOSCQ en prenant les précautions habituelles, (Cf. FLEURY [45] et CANALS [28]).

1° Opérer en chambre noire.

2° Utiliser une lumière diffuse et constante (lampe en verre dépoli : 50 bougies 1/2 watt).

3° Colorimètre immuable pendant les mesures.

Deux conditions essentielles doivent en outre être remplies si l'on veut effectuer de bonnes comparaisons :

1° Il ne doit pas y avoir trop d'écart entre les deux intensités de coloration que l'on veut comparer : la hauteur lue avec l'échantillon à doser ne doit pas différer de plus de 25 p. 100 de celle de l'étalon.

2° La hauteur sous laquelle on observe le liquide étalon doit être fixée au préalable en tenant compte de l'erreur relative qui peut en résulter. La sensibilité de l'œil varie en effet avec l'intensité de la coloration observée.

Nous avons adopté les chiffres extrêmes suivants :

Pour 0 mg.,02 de Fe dans un volume de 10 cm³, nous examinons sous 20 mm.

Pour 0 mg.,05 de Fe dans un volume de 10 cm³, nous examinons sous 5 mm.

**PROPORTIONNALITÉ ENTRE L'INTENSITÉ DE LA COLORATION
ET LA TENEUR EN FER.**

Avant toute application, nous avons tenu à nous assurer qu'il existe bien une proportionnalité entre l'intensité de la coloration du sulfocyanate ferrique et la teneur en fer de la solution examinée.

Pour cela nous avons préparé diverses dilutions d'une solution de perchlorure de fer de titre connu et nous les avons comparées entre elles.

La coloration rouge sang a été obtenue d'après la technique suivante :

Fer (en solution titrée) 0 mg.,025 à 0 mg.,40	
Acide chlorhydrique officinal (D = 1,17)....	1 cm ³
Solution de sulfocyanate de potassium à 50 g. pour 100 cm ³	1 cm ³
Eau distillée Q.S.P.	10 cm ³

La comparaison a lieu immédiatement ; les résultats, consignés dans le tableau suivant, montrent que la proportionnalité entre l'intensité de la coloration et la teneur en fer est satisfaisante et permet un dosage correct.

	Solution étalon	Solution à comparer		
Fe en mg.	0,025	0,0125	0,05	0,10
Hauteur lue en mm.	10	20,5	5,0	2,52
Fe en mg.	0,10	0,05	0,10	0,20
Hauteur lue en mm.	10	20,2	10,1	5,0
Fe en mg.	0,20	0,15	0,20	0,30
Hauteur lu	10	13,7	10	6,8
Fe en mg.	0,40	0,20	0,30	0,50
Hauteur lue en mm.	5	10,1	6,6	4,1
(Moyennes de 4 mesures)				

IMPORTANCE DE LA RAPIDITÉ DE L'EXAMEN COLORIMÉTRIQUE.

Au cours de notre vérification de la méthode nous avons constaté que nos résultats étaient entachés d'erreurs par défaut et que ces erreurs étaient d'autant plus grandes que le temps écoulé entre la formation du sulfocyanate ferrique et l'examen colorimétrique était plus long.

EXEMPLE. — Nous avons comparé entre elles les colorations développées dans deux solutions identiques à 0 mg., 10 de Fe. L'une des colorations avait été obtenue immédiatement avant la mesure, l'autre datait de 3 heures.

Nous avons constaté un affaiblissement de la coloration la plus ancienne entraînant une erreur évoluée à 23 p. 100. D'ailleurs, même si l'examen colorimétrique est effectué immédiatement après la réaction, les résultats sont toujours entachés d'une erreur par défaut et cette erreur paraît d'autant plus grande que l'on s'adresse à des quantités plus faibles de fer.

Il faut donc admettre que la coloration rouge sang du sulfocyanate ferrique évolue rapidement dès sa formation ; l'hypothèse la plus simple qui se présente à l'esprit pour expliquer ce phénomène est celle d'une réduction du sel ferrique, en présence du grand excès de sulfocyanate de potassium.

STABILISATION DE LA COLORATION.

Pour stabiliser en quelque sorte la coloration rouge sang du sulfocyanate ferrique, nous avons pensé à ajouter au milieu réactionnel un système oxydant (eau oxygénée, cuivre) en solution très diluée.

Nous avons préparé :

1° Une solution d'eau oxygénée :

Eau oxygénée à 100 volumes....	5 cm ³
Eau distillée q.s.p.....	100 cm ³

2° Une solution de sulfate de cuivre (SO_4Cu , 5 H_2O) à 1 pour mille.

Technique.

Dans une fiole jaugée de 10 cm^3 ajouter successivement, en refroidissant :

Fer (en solution) 0 mg.,2 à 0 mg.,50	
Acide chlorhydrique officinal.....	1 cm^3 ,5
Solution de sulfocyanate de potassium.....	1 cm^3
Solution de sulfate de cuivre à 1 p. 1000..	1 goutte
Solution d'eau oxygénée diluée.....	11 gouttes
Eau distillée q.s.p.....	10 cm^3

Préparer un témoin de la même façon, refroidir sous un courant d'eau et comparer immédiatement.

Vérification de la méthode.

Nous avons préparé des solutions diluées de perchlorure de fer de titres connus, vérifiées par gravimétrie et par la méthode volumétrique de FONTÈS-THIVOLLE.

Les dosages de ces solutions, effectués selon la technique ci-dessus décrite ont donné les résultats suivants (moyennes de quatre mesures).

Fer à doser en mg.	Témoins	H compa- raison	H' résultats	Résultats Fe en mg.	Teneur p. 100
0,02	0,03	25	33	0,023	+ 15
0,02			31	0,024	
0,05	0,03	20	12,5	0,048	— 4
0,05			12,9	0,047	
0,10	0,15	15	24,1	0,093	— 7
0,10			24,8	0,090	
0,20	0,15	10	7,90	0,195	— 2,5
0,20			7,95	0,195	
0,30	0,50	10	16,1	0,31	+ 3,3
0,30			16,3	0,307	
0,50	0,60	5	6,25	0,48	— 4
0,50				0,47	

CONCLUSIONS.

L'utilisation du système oxydant, eau oxygénée-cuivre, permet d'obtenir des résultats corrects, ce qui vient à l'appui de notre hypothèse.

Nous sommes désormais en possession d'une méthode permettant de doser de très faibles quantités de fer de 0 mg.,05 à 0 mg.,50 avec des erreurs dont la limite supérieure peut être fixée à 5 p. 100 environ.

DOSAGE DU FER DANS LA MATIÈRE ORGANIQUE.

L'application de la méthode précédente au dosage du fer dans les cendres n'offre aucune difficulté notable. Toutefois, pour la solubilisation de l'oxyde ferrique on ne peut utiliser le traitement par fusion avec un bisulfate alcalin : dans ce cas, en effet, le sulfate de calcium, qui subsiste après reprise par l'eau du produit de la fusion, retient énergiquement des quantités de fer susceptibles de fausser le dosage. Il est indispensable de solubiliser l'oxyde ferrique à l'aide de l'acide chlorhydrique concentré, au bain-marie bouillant, en recouvrant la capsule d'un verre de montre.

Les métaux : cuivre, manganèse, aluminium n'apportent aucune perturbation.

Nous avons fait des dosages de fer dans des sucres d'arbre à laque à la fois par la méthode de FONTÈS et THIVOLLE et par notre méthode au sulfocyanate : les résultats ont été très satisfaisants (limite supérieure de l'erreur : 5 p. 100). La technique de la calcination est la même que celle qui est utilisée pour le manganèse ; mais on doit prendre des précautions spéciales pour éviter de souiller les cendres par des poussières ferrugineuses.

CHAPITRE III.

Dosage du manganèse.

Pour la détermination du manganèse, nous avons utilisé la méthode bien connue, qui consiste à faire passer tout le manganèse à l'état de permanganate, et à doser ce dernier, soit par volumétrie soit par colorimétrie.

La transformation du manganèse en permanganate s'effectue par une oxydation brutale en milieu acide. Les réactifs oxydants utilisés sont : les peroxydes de plomb ou de bismuth, les persulfates de potassium ou d'ammonium [77]. Plus récemment encore le periodate de sodium et l'hypobromite de sodium ont été employés [32].

Nous avons adopté dans ses grandes lignes, le procédé d'oxydation préconisé par M. MARSHALL [77] et PROCTER SMITH [89] qui consiste à transformer un sel manganeux en acide permanganique à l'aide de la chaleur, et par action du persulfate de potassium et du nitrate d'argent.

Ce procédé, très simple en apparence, comporte en réalité deux sortes de difficultés.

1° L'oxydation du sel manganeux, en acide permanganique n'est complète, que si l'on opère dans des conditions bien déterminées.

2° Le dosage ultérieur de l'acide permanganique par volumétrie, peut être troublé par l'excès des réactifs utilisés pour l'oxydation du sel manganeux.

Nous avons fait de nombreux essais pour déterminer les conditions nécessaires dans lesquelles il faut se placer pour réaliser un dosage suffisamment exact.

I. — Oxydation du sel manganoux en acide permanganique.

Conditions à remplir pour une oxydation totale.

L'oxydation du sel manganoux en acide permanganique, peut être plus ou moins gênée par la précipitation d'oxyde de manganèse, provenant de l'action du persulfate de potassium ou du sel manganoux (non encore oxydé), sur l'acide permanganique qui se forme au cours de l'oxydation. Toutes ces réactions secondaires dépendent de la concentration du sel manganoux, de la nature et de la concentration de l'acide utilisé.

A. — ACTION DU PERSULFATE DE POTASSIUM SUR L'ACIDE PERMANGANIQUE.

En milieu neutre ou faiblement acide, le persulfate de potassium réagit sur l'acide permanganique pour donner un précipité d'oxyde de manganèse.

C'est d'ailleurs sur cette réaction qu'est basée la méthode de dosage du manganèse de KNORRE.

En présence de nitrate d'argent et en milieu sulfurique à 3 p. 100, la réaction précédente n'est plus à craindre.

B. — ACTION DU SEL MANGANEUX SUR L'ACIDE PERMANGANIQUE.

C'est la réaction secondaire la plus importante, en milieu neutre, le sel manganoux non encore oxydé, réduit l'acide permanganique avec formation d'un précipité d'oxyde de manganèse hydraté, GUYARD et WOLHARD [51] ont donné une méthode de dosage du manganèse basée sur ce principe.

En milieu acide, l'oxydation du sel manganoux en permanganate, devient possible surtout si l'on a soin d'opérer en présence de nitrate d'argent, qui joue le rôle de catalyseur. Cependant la marche de cette oxydation dé-

pend de la nature et de la concentration de l'acide minéral utilisé et d'autre part de la concentration du sel manganéux à oxyder.

1° *Nature et concentration de l'acide à utiliser.*

MARSHALL conseille l'acide nitrique, G. BERTRAND [20] a préconisé d'abord un milieu nitrique peu acide, puis un milieu nitrique beaucoup plus concentré. VILLARD et GREATHOUS utilisent l'acide sulfurique à 20 p. 100, récemment DENIGÈS a employé également l'acide sulfurique. EDER [34], MATHEVET [78] ont proposé l'acide phosphorique. BERTIAUX [12] a fait une étude soignée, de l'influence des acides sur la marche de l'oxydation. D'après cet auteur, on peut oxyder en milieu phosphorique des quantités de manganèse voisines de 50 mg.

Pour tous ces auteurs le but à atteindre était d'oxyder complètement des quantités de manganèse relativement élevées ; pour nous le problème est plus simple, la quantité de manganèse mise en jeu ne dépassant jamais 2 mg.

Nous avons effectué les essais d'oxydation sur des quantités de manganèse allant de 0 mg.,05 à 2 mg., en utilisant une solution de SO_4Mn telle que, $1 \text{ cm}^3 = 0 \text{ g.},001$ de Mn métal. En maintenant fixe la quantité de persulfate de potassium et celle de nitrate d'argent, nous avons essayé successivement, pour une même quantité de manganèse, les acides azotique, sulfurique et phosphorique à diverses concentrations.

Tous ces essais sont réalisés d'après la technique suivante :

Solution de sulfate de manganèse (1 p. 1000 en Mn):	variable
Solution d'acide (nature et concentration variable)...	20 cm^3
Solution de nitrate d'argent $\frac{\text{N}}{10}$	XV gouttes
Solution de persulfate de potassium à 5 p. 100.....	10 cm^3

On porte à l'ébullition que l'on maintient trois minutes.

Résultats :

a) Avec l'acide azotique $D = 1,33-36^\circ$ B dilué à 50 p. 100, 25 p. 100, 12,5 p. 100 en volume.

Mn en mg.	Acide azotique à 50 p. 100 en volume	Acide azotique à 25 p. 100 en volume	Acide azotique à 25 p. 100 en volume
2	coloration violette précipité	coloration rose précipité	précipité
1	coloration violette	précipité	coloration violette
0,5	»	coloration violette	»
0,2	»	»	»
0,1	»	»	»
0,05	coloration rose faible	»	»

b) Avec l'acide sulfurique $D = 1,833$ à 93° dilué à 40 p. 100, 20 p. 100 et 10 p. 100 en volume.

Mg en mg.	Acide sulfurique à 40 p. 100 en volume	Acide sulfurique à 20 p. 100 en volume	Acide sulfurique à 10 p. 100 en volume
2	pas d'oxydation	précipité	coloration violette précipité
1	»	coloration violette	coloration violette
0,5	»	»	»
0,2	»	»	»
0,1	»	»	»
0,05	»	»	»

c) Avec l'acide phosphorique $D = 1,710$ dilué à 12 p. 100, 6 p. 100 en volume.

Mn en mg.	Acide phosphorique à 6 p. 100 en volume	Acide phosphorique à 12 p. 100 en volume
2	coloration violette	coloration violette
1	»	»
0,5	»	»
0,2	»	»
0,1	»	»
0,05	»	»

Conclusions. — Avec la solution d'acide azotique à 50 p. 100, l'oxydation est incomplète, on obtient bien une coloration, mais celle-ci est toujours plus faible que celle d'une solution de permanganate correspondant à la quantité de manganèse mise en expérience.

L'acide azotique à 25 p. 100, utilisé par Gabriel BERTRAND, ne permet pas l'oxydation complète de quantités de Mn, supérieures à 0 mg.,5.

L'acide azotique à 12,5 p. 100 permet d'oxyder seulement 1 mg. de Mn.

Avec l'acide sulfurique à 40 p. 100 l'oxydation du Mn, est impossible.

Les solutions sulfuriques à 20 et à 10 p. 100 permettent d'oxyder 1 mg. de Mn.

C'est en milieu phosphorique que l'oxydation s'effectue le plus facilement. Les solutions à 12 p. 100 et à 6 p. 100, permettent l'oxydation intégrale de 2 mg. de Mn.

2° Quantité de persulfate à utiliser pour obtenir une réaction complète.

Dans les essais précédents, nous avons utilisé des quantités de persulfate relativement élevées. Il est cependant du plus grand intérêt, comme nous le verrons par la suite de réduire ces quantités au strict minimum, pour éviter des réactions perturbatrices lors du dosage volumétrique de l'acide permanganique. Nos essais ont porté sur le maximum de manganèse à oxyder (2 mg.). La technique utilisée est la suivante :

Solution de sulfate de manganèse (1/1000 en Mn).....	2 cm ³
Solution d'acide phosphorique à 12 p. 100....	20 cm ³
Solution de nitrate d'argent N/10.....	XV gouttes
Solution de persulfate de potassium 5 p. 100..	variable
Eau distillée q.s.p.....	20 cm ³

Quantité de persulfate en cm ³	Résultat observé
10	coloration violette
5	» »
3	» »
2	» »
1	précipité »

Il résulte de ce dernier essai, que deux centimètres cubes d'une solution de persulfate de potassium à 5 p. 100 suffisent pour oxyder deux milligrammes de manganèse. Toutefois nous nous sommes arrêtés à une quantité de persulfate légèrement supérieure ; (3 cm³ environ soit 0 g.,15 de S₂O₈K₂).

3° Quantité de nitrate d'argent à utiliser.

Le nitrate d'argent joue le rôle de catalyseur dans cette réaction. Son action a été étudiée par TRAVERS [102].

Les quantités de nitrate d'argent à utiliser sont assez variables et dépendent de la quantité de manganèse à oxyder.

Pour oxyder 2 mg. de manganèse, TRAVERS [102] utilise 1 cm³ de la solution décimormale de nitrate d'argent. Nous avons toujours obtenu des résultats satisfaisants en employant XV gouttes de cette même solution.

Conclusions. — De cette étude il résulte que nous pouvons facilement transformer des quantités de manganèse, de l'ordre de 2 mg. en acide permanganique en utilisant la technique suivante :

Solution sel manganoux (1/100 en Mn)..... 2 mg.
 Solution acide phosphorique 12 p. 100..... 20 cm³
 Solution nitrate d'argent N/10..... XV gouttes
 Solution de persulfate de potassium 5 p. 100. 3 cm³

porter à l'ébullition et la maintenir 3 minutes.

II. — Dosage volumétrique du manganèse.

Pour doser volumétriquement l'acide permanganique provenant de l'oxydation du manganèse à l'aide de la technique indiqué ci-dessus, nous avons utilisé l'eau oxygénée (MALAPRADE [76]).

Mais ce réactif, comme d'ailleurs tous les réactifs de l'acide permanganique (acide oxalique, anhydride arsénieux, sulfate ferreux) est facilement oxydé par le persulfate de potassium, surtout en présence du nitrate d'argent.

Nous avons fait une étude spéciale du système eau oxygénée-persulfate de potassium et nitrate d'argent (1). L'eau oxygénée est rapidement décomposée.

Avant de procéder au dosage de l'acide permanganique, il est donc nécessaire de faire disparaître l'excès de persulfate de potassium. Le seul moyen pratique est l'action de la chaleur, mais l'acide permanganique, quoique moins sensible que le persulfate, peut être également décomposé, si l'on pousse un peu trop loin l'action de la chaleur.

Pour sortir de ce dilemme, il faut, pour chaque dosage, déterminer le temps nécessaire pour décomposer l'excès de persulfate sans que l'acide permanganique soit sensiblement altéré.

La durée de chauffage doit être fixée avec une grande précision avant chaque dosage par des essais préliminaires, effectués dans des conditions identiques à celles du dosage lui-même, sur des solutions de manganèse de titre connu.

Variable selon le mode de chauffage, il est généralement compris entre 10 et 12 minutes. Sa détermination, longue et fastidieuse, constitue l'inconvénient principal de la méthode volumétrique.

La destruction du persulfate étant réalisée, le dosage

(1) Pour ne pas rendre cet exposé fastidieux, nous jugeons inutile de reproduire ici, les résultats obtenus dans cette étude.

de l'acide permanganique sera effectué par addition d'un volume déterminé d'eau oxygénée titrée, et l'excès d'eau oxygénée sera dosé par une solution connue de permanganate de potassium sensiblement équivalente à l'eau oxygénée utilisée.

RÉACTIFS UTILISÉS.

1° Solution à 12 p. 100 en volume d'acide phosphorique à 60° B ($D = 1,71$).

2° Solution saturée de persulfate de potassium obtenue en agitant 5 g. de persulfate de potassium avec 100 cm³ d'eau (dissolution incomplète). La solution, neutre au début, devient peu à peu acide.

3° Solution de nitrate d'argent $\frac{N}{10}$

4° Solution de permanganate de potassium $\frac{N}{10}$ servant à préparer les solutions $\frac{N}{100}$, $\frac{N}{200}$, $\frac{N}{250}$, $\frac{N}{400}$.

5° Solution d'eau oxygénée correspondant aux solutions de permanganate ci-dessus.

6° Acide chlorhydrique pur.

7° Acide sulfurique pur.

a) Technique.

Détermination du temps de chauffage. Ce temps doit être exactement déterminé à 5 ou 10 secondes près, dans des conditions absolument identiques. Utiliser deux becs Bunsen, l'un servant à porter rapidement l'essai à l'ébullition, le second réglé d'avance, sert à déterminer l'oxydation du manganèse et à détruire l'excès de persulfate.

b) Oxydation du manganèse.

Dans une fiole conique de 120 ou 150 cm³, introduire la solution du manganèse à doser et ajouter :

Solution d'acide phosphorique à 12 p. 100 ..	20 cm ³
Eau distillée	20 cm ³
Solution de nitrate d'argent N/10.....	XV gouttes

porter à l'ébullition, ajouter 3 cm³ exactement mesurés de la solution de persulfate de potassium à 50 p. 100. Dès que l'oxydation est effectuée, porter la fiole sur un deuxième bec Bunsen à petite flamme pour avoir une ébullition régulière et laisser pendant un temps préalablement déterminé.

c) Dosage de l'acide permanganique.

Refroidir, ajouter 10 cm³ de H₂O₂ exactement titrée, et doser l'excès d'eau oxygénée par une solution de permanganate.

CALCUL.— Si X = Manganèse dans la prise d'essai.

A = Valeur de 10 cm³ H₂O₂ en permanganate.

N = le nombre de cm³ de solution de permanganate.

On aura $X = (A - n)$; x titre du permanganate en Mn.

Selon la teneur en manganèse, on utilisera des solutions de permanganate $\frac{N}{100}$, $\frac{N}{200}$, $\frac{N}{250}$, $\frac{N}{400}$ et les solutions d'eau oxygénée correspondantes.

VÉRIFICATION DE LA TECHNIQUE. — Pour vérifier la technique indiquée ci-dessus, nous avons effectué des dosages de manganèse à l'aide de solutions de manganèse de titre connu.

A) Pour éliminer les causes d'erreur pouvant provenir des solutions titrées de sel manganoux, nous avons adopté le mode opératoire suivant :

Nous prenons un volume déterminé d'une solution de permanganate (solutions $\frac{N}{100}$, $\frac{N}{200}$, $\frac{N}{250}$) que nous réduisons à l'état de sel manganoux, ceci en opérant en milieu phosphorique, à l'aide d'une solution correspondante d'eau oxygénée.

Nous portons le produit de cette réduction à l'ébullition, ce qui détruit le léger excès d'eau oxygénée qu'on aurait pu verser. Nous transformons à nouveau ce sel manganeux en acide permanganique par la technique ci-dessus, et après refroidissement, nous dosons à nouveau l'acide permanganique par la même solution d'eau oxygénée, nous devons retrouver le même volume.

Voici les conditions de nos expériences :

Solution de permanganate de potassium $N/250$. = $N \text{ cm}^3$
 Eau distillée..... = 20 cm^3
 Solution d'acide phosphorique à 12 p. 100 = 20 cm^3
 Solution de nitrate d'argent $N/10$ = XV gouttes

Réduire le permanganate par H_2O_2 en très faible excès, porter à l'ébullition et ajouter le persulfate de potassium à 5 p. 100 (3 cm^3), le temps convenable pour la destruction du persulfate ayant été déterminé au préalable.

Voici nos résultats :

Mn introduit exprimé en $MnO_4K \frac{N}{250}$ (en cm^3)	Sol. H_2O_2 ajoutée (en cm^3)	Sol. $MnO_4K \frac{N}{250}$ pour détruire l'excès de H_2O_2		Erreur absolue en cm^3 de $MnO_4K \frac{N}{100}$
		théorique	trouvé	
1	10	9,40	9,35	— 0,05
2	10	8,40	8,40	0
5	10	5,40	5,30	— 0,10
10	20	10,80	10,70	— 0,10
20	20	0,80	0,60	— 0,20

$10 \text{ cm}^3 H_2O_2 = 10 \text{ cm}^3,40 MnO_4K \frac{N}{250}$

Temps de destruction du persulfate : 11 minutes 10 secondes.

Mn introduit, exprimé en $\text{MnO}_4\text{K} \frac{\text{N}}{250}$ (en cm^3)	Sol. $\text{H}_2 \text{O}_2$ ajoutée (en cm^3)	Sol. $\text{MnO}_4\text{K} \frac{\text{N}}{100}$ pour détruire l'excès de H_2O_2		Erreur absolue en cm^3 de $\text{MnO}_4\text{K} \frac{\text{N}}{100}$
		trouvé	théorique	
1	10	9,80	9,70	— 0,10
2	10	8,80	8,65	— 0,15
5	10	5,80	5,70	— 0,10
10	10	0,80	0,85	+ 0,05
20	20	1,60	1,40	— 0,20

$10 \text{ cm}^3 \text{ H}_2\text{O}_2 = 10 \text{ cm}^3,80 \text{ MnO}_4\text{K} \frac{\text{N}}{100}$

Temps de destruction du persulfate : 12 minutes 10 secondes.

B) Nous avons en outre effectué des dosages de manganèse sur des solutions de sulfate de manganèse pur, dont la composition centésimale avait été déterminée par gravimétrie :

		Mn métal.....	32,23 p. 100
			32,19 —
			32,34 —
Sulfate de manganèse.... (analyse)	}	SO.....	56,92 —
			57,05 —
		H_2O	10,82 —
			10,81 —
			10,78 —

ce qui correspond à $\text{SO}_4\text{Mn}, \text{H}_2\text{O}$.

Calculé pour $\text{SO}_4\text{Mn}, \text{H}_2\text{O}$: Mn p. 100 32,14, SO_4 p. 100 : 57,4, H_2O p. 100 : 10,71.

Avec ce sel nous avons préparé une solution renfermant 1 g. de Mn par litre (3 g.,09 de sel).

Voici les résultats trouvés.

Mn à doser en mg.	H ₂ O ₂ utilisé en cm ³	Mn O ₄ K utilisé en cm ³	Résultats obtenus Mn retrouvé	Erreur p. 100
0,05	10	8,90	0,0453	— 9,6
0,05	10	8,80	0,0481	4
0,10	10	6,95	0,099	— 1,0
0,10	10	6,75	0,104	+ 4
0,20	10	3,05	0,198	— 1
0,20	10	3,10	0,196	— 2
0,5	10	9,00	0,506	+ 1,2
0,5	10	8,90	0,510	+ 2
1	10	3,40	0,979	— 2,1
1	10	3,20	1,001	0
2	20	6,60	1,98	— 1
2	20	6,50	1,99	— 0,5

APPLICATION AU DOSAGE VOLUMÉTRIQUE DU MANGANÈSE DANS LE SUC D'ARBRE À LAQUE.

Nous avons dosé volumétriquement le manganèse dans quelques échantillons de suc d'arbre à laque.

Pour la destruction de la matière organique, nous avons adopté la technique de Gabriel BERTRAND.

On incinère au rouge sombre jusqu'à disparition presque complète du charbon. On laisse refroidir. Le Mn est à l'état de O₃Mn₂. Le résidu est repris par l'acide chlorhydrique au bain-marie. La liqueur devient brunâtre ; on évapore à sec, le fond de la capsule reste coloré en jaune, ce qui est dû à la présence du fer ; on reprend par de l'eau acidulée par l'acide sulfurique, on évapore à sec, et on calcine à nouveau. Les sulfates étant moins fusibles que les chlorures, on peut ainsi brûler plus facilement les dernières traces de charbon.

On reprend à chaud le résidu de la calcination par la solution d'acide phosphorique à 12 p. 100, puis par l'eau et on effectue le dosage suivant la technique déjà indiquée.

Voici les résultats de 2 séries de dosage du manganèse sur deux échantillons de suc de l'arbre à laque.

Volume de suc en cm ³	Manganèse dans la prise d'essai en mg.	Mn p. 100 en mg.
Suc A... 2	1,41	70,5
— 2	1,35	67,5
— 2	1,38	69,0
— 1	0,68	68,0
— 1	0,71	71,0
— 0,5	0,39	78,0
Suc B... 2	2,02	101
— 2	2,00	100
— 1	0,98	98

III. — Dosage colorimétrique du manganèse.

C'est cette méthode que nous avons le plus souvent utilisée dans notre travail, surtout lorsque nous avons opéré sur des préparations de laccase à un degré de purification très poussé, où la teneur en manganèse reste comprise entre quelques centièmes et quelques millièmes de milligramme.

Cette méthode colorimétrique ne présente pas l'inconvénient de la méthode volumétrique, c'est-à-dire la détermination préliminaire du temps de chauffage nécessaire pour détruire complètement l'excès de persulfate sans décomposer l'acide permanganique.

La sensibilité de la méthode colorimétrique est telle

qu'on peut apprécier la coloration rose de l'acide permanganique avec 0 mg.,001 de Mn, (1 γ) sous un volume de 2 cm³, ce qui correspond à 0 mg.,5 de Mn par litre.

Nous avons utilisé pour le dosage colorimétrique le même principe que pour le dosage volumétrique.

Seul le mode opératoire varie selon les concentrations du manganèse à doser. Plus la concentration est faible, plus on s'efforce de réduire le volume des réactifs.

Voici les différentes techniques que nous avons adoptées suivant les teneurs en manganèse de nos prises d'essais.

- A) 2 mg. < Mn < 0 mg.,2 opérer sous un volume de 10 cm³
- B) 0 mg.,2 < Mn < 0 mg.,05 opérer sous un volume de 5 cm³
- C) 0 mg.,05 < Mn < 0 mg.,01 opérer sous un volume de 2 cm³

Technique A.

Manganèse à doser (2 mg. à 0 mg.,2).....	2 cm ³
Solution d'acide phosphorique à 12 p. 100....	5 cm ³
Solution de persulfate de potassium.....	3 cm ³
Solution de nitrate d'argent N/10.....	V gouttes

mettre au bain-marie bouillant 6 minutes. Laisser refroidir. Compléter à 10 cm³ dans une fiole jaugée. Opérer de même avec 3 témoins renfermant 1 m.,05 et 0 mg.,30 de Mn. Puis faire la mesure au colorimètre (pour les précautions à prendre lors des mesures colorimétriques voir le dosage du fer).

Technique B.

Manganèse à doser (0 mg.,2 à 0 mg.,05).....	1 cm ³
Solution d'acide phosphorique à 12 p. 100..	2 cm ³
Solution de persulfate de potassium.....	1 cm ³
Solution de nitrate d'argent	II gouttes

mettre au bain-marie bouillant 6 minutes. Laisser refroidir. Compléter à 5 cm³ dans une fiole jaugée, opérer de même avec des témoins contenant 0 mg.,10, 0 mg.,05 de Mn, faire la comparaison au moyen d'un petit colorimètre.

Technique C.

Dans le tube jaugé de 2 cm³, mesurer dans l'ordre :

Manganèse à doser (0 mg.,05 à 0 mg.,01).....	0 cm ³ ,5
Solution d'acide phosphorique à 12 p. 100....	1 cm ³
Solution de persulfate de potassium.....	0 cm ³ ,5
Solution de nitrate d'argent	1 goutte

porter 3 minutes au bain-marie, refroidir faire des témoins 0 mg.,05, 0 mg.,02, 0 mg.,01 de Mn, et comparer au petit colorimètre.

Pour les quantités de Mn, allant de 0 mg.,01 à 0 mg.,001 nous ne pouvons plus utiliser le colorimètre, car la coloration rose de l'acide permanganique est extrêmement faible. Nous obtenons une bonne approximation en établissant une gamme renfermant 0 mg.,001, 0 mg.,002, 0 mg.,003, 0 mg.,0001 de manganèse dans un volume de 2 cm³ auquel nous comparons notre essai. La technique est la même qu'en C, c'est-à-dire qu'on opère sous un volume de 2 cm³ avec chauffage de 3 minutes au bain-marie.

Voici les résultats obtenus sur des solutions pures de Mn :

Mn en mg.	Volume total en cm ³	Mn témoin en mg.	Mesurés sous mm.	Résultats mesurés en mm.	Résul- tat en Mn	Erreur p. 100
2	10	1	12	5,8	2,06	+ 3
2	10	1	12	5,7	2,1	+ 5
1	10	1	10	10,1	0,99	— 1
1	10	1	10	10,0	0,99	— 1
0,50	10	0,30	15	9,0	0,50	0
0,30	10	0,30	15	14,9	0,30	0
0,30	10	0,30	15	14,9	0,30	0
0,20	10	0,20	15 et 20	14,9 et 2,01	0,2	0
0,10	2	0,10	15 et 20	15,2	0,098	— 2
0,10	2	0,10	15 et 20	15,3	0,98	— 2
0,05	2	0,05	15	15,4	0,048	— 4
0,02	2	0,02	30	3,15	0,019	— 5
0,01	2	0,02	50	48	0,0105	+ 5

DOSAGE COLORIMÉTRIQUE DU MANGANÈSE DANS LE SUC
D'ARBRE A LAQUE.

La destruction de la matière organique se fait comme précédemment, pour de très faibles teneurs en Mn. On a intérêt à opérer dans de très petites capsules de façon à pouvoir reprendre le résidu avec 2 cm³ de liquide. Grâce à l'acide phosphorique, la présence de fer ne trouble pas la coloration de l'acide permanganique.

Voici les résultats de dosages du Mn, dans du suc d'arbre à laque effectués selon les techniques A.B.C.

Volume de suc en mg.	Manganèse avant la prise d'essai en mg.	Mn p. 100 en mg.
1	0,65	65,0
1	0,68	68,0
1	0,68	68,0
0,5	0,37	74,0
0,5	0,35	70,0
0,2	0,13	65,0
0,2	0,13	65,0
0,1	0,05	50,0
0,1	0,06	60,0

DEUXIEME PARTIE (1).

Suc de laque. — Laccase.

La matière première qui a servi à nos recherches, est le suc de l'arbre à laque du Tonkin, très aimablement mis à notre disposition par l'Agence économique du Gouvernement Général de l'Indochine, à qui nous adressons nos plus sincères remerciements.

Le suc d'arbre à laque du Tonkin est un liquide visqueux qui s'écoule à la suite d'incisions de plusieurs espèces d'arbres de la famille des Anacardiacees, notamment du *Rhus succedanea* (L. Fils Var-Dumontieri) du Tonkin, et du *Melannorhea laccifera* (Pierre) du Cambodge, connus tous les deux par les indigènes sous le nom de « *Gây Son* » (2).

Les produits des récoltes journalières sont versés dans des récipients constitués par des paniers en bambous (sampa) imperméabilisés par ce même latex mélangé avec un tiers d'argile.

Par un repos prolongé, ce latex se sépare en plusieurs couches de densités différentes. On arrive ainsi à séparer 4 à 5 couches qui, comptées à partir du bas, sont de moins en moins aqueuses et de plus en plus riches en matières résineuses (laccol), la couche inférieure étant constituée par un liquide exclusivement aqueux, les couches supérieures contenant une partie considérable

(1) Les principaux résultats exposés dans cette deuxième partie ont été publiés en collaboration avec M. P. FLEURY [46 bis].

(2) Le suc d'arbre à laque du Japon est fourni par une espèce voisine : le *Rhus vernicifera* D. C.

de laccol. Généralement les couches inférieures sont les plus riches en laccase. La valeur commerciale des couches augmente d'après leur rang, comptées de bas en haut, ce sont les couches supérieures qui sont utilisées pour la préparation des laques.

Pour nos recherches, nous avons employé un liquide désigné sous le nom de « Nuoc' Son » qui paraît provenir du mélange d'une partie de « *Son Thit* » laque inférieure moyennement riche en ferment pour trois parties de « *Nuoc Thiec* » (eau de laque très riche en ferments).

Son Thit et Nuoc Thiec étant les couches les plus inférieures leur valeur commerciale est minime.

I. — Propriétés physiques.

Ce latex se présente sous l'aspect d'un liquide trouble plus ou moins visqueux, d'odeur spéciale, de couleur brunâtre noircissant rapidement à l'air. Sa réaction est acide, son pH est voisin de 4,7 (déterminé colorimétriquement avec le rouge de méthyle). Sa densité variable selon les échantillons est comprise entre 1,241 et 1,357 à 15°.

II. — Propriétés chimiques et composition.

De nombreux auteurs (YOSHIDA [124], MIYAMA et TAKAYAMA [83], G. BERTRAND [13], TCHIREH et STEVENS [100], SUMINOKURA [99] se sont occupés de l'étude chimique de ce suc d'arbre à laque soit du Tonkin, soit du Japon.

Gabriel BERTRAND [21], a donné la composition qualitative du suc d'arbre à laque du Tonkin. D'après cet auteur, ce suc renferme :

a) Des matières gommeuses (arabane et galactane), qui par hydrolyse avec l'acide chlorhydrique étendu, donnent de l'arabinose et du galactose.

b) Du laccol, produit rubéfiant insoluble dans l'eau,

soluble dans l'alcool, l'éther, très oxydable à l'air.

c) Des substances azotées.

d) Des cendres renfermant du manganèse.

Voici d'après G. BERTRAND, la composition quantitative du précipité alcoolique de ce suc après dessiccation.

Humidité à 120	7,4	p. 100
Gommes (arabane et galactane).....	86,77	p. 100
Azote	0,41	p. 100
Cendres riches en manganèse	5,58	p. 100

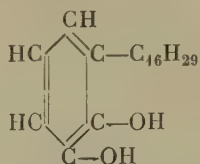
Dans une autre analyse, Gabriel BERTRAND, indique, que la teneur en manganèse est de 2,5 p. 100 des cendres.

SUMINOKURA [99] a étudié d'autre part des laques du Japon. Cet auteur signale que la composition chimique varie selon les suc. Il donne les chiffres suivants : teneur en eau 20 p. 100 ; teneur en urishiol 70 p. 100. Le reste étant constitué par des substances gommeuses, azotées et minérales. Les cendres renferment peu de manganèse, mais par contre elles sont très riches en fer.

L'urishiol, partie importante de ce suc, a été étudié par MIYAMA et TAKAYAMA [83], il présenterait une structure dioxybenzoïque à longue chaîne latérale. Sa formule d'après ces auteurs, semble être $C_{21}H_{32}O_2$.

Le laccol de BERTRAND ne serait peut être pas identique à l'urishiol des auteurs japonais. Son étude a été récemment reprise par G. BERTRAND et G. BROOKS [26].

Ces auteurs ont pu l'obtenir à l'état cristallisé fusible à $+ 23^\circ$. Sa formule brute est $C_{22}H_{34}O_2$ et sa formule de constitution correspondrait au schéma ci-dessous :



De notre côté nous avons étudié des échantillons différents de Nuoc-Son provenant du Tonkin et du Cambodge, qui nous ont servi pour nos recherches.

Voici leur composition quant à leur teneur en manganèse en fer et en azote.

Suc	Extrait sec en g. p. 100 de suc	Cendres sulf. en g. p. 100 de suc	Mn en g. p. 100 de cendres	Fer en g. p. 100 de cendres	Azote en g. p. 100 d'extrait
A	39,7	4,9	1,47	1,2	0,32
B	51,20	4,2	2,31	0,75	0,40
C	41,20	4,2	2,8	0,90	0,43
D	39,9	4,5	1,55	2,22	0,42

D'après ces chiffres, on voit que ces sucs renferment une grande quantité de matières organiques (teneur moyenne 40 p. 100 environ).

Elles sont principalement constituées par des matières gommeuses, les teneurs en manganèse et en fer sont assez importantes, par contre la teneur en azote est relativement faible. Tous ces chiffres se rapprochent sensiblement de ceux donnés par G. BERTRAND. Ce suc renferme en outre la diastase oxydante, découverte par Gabriel BERTRAND, en 1894 et qu'il a nommé laccase à cause de son origine. La laccase est la première en date des diastases oxydantes connues, et sa découverte a ouvert à la chimie biologique des horizons nouveaux, permettant l'interprétation d'un grand nombre de phénomènes biologiques, jusque là inexplicables.

Cette diastase oxydante rentre dans le groupe des oxydases proprement dite ou aéroxydases de BOURQUELOT. CHODAT et BACH la considèrent comme une oxygénase, c'est-à-dire une partie d'une diastase dont le tout serait constitué par un système oxygénase peroxydase. Enfin dans la classification d'OPPENHEIMER [86] la laccase est considérée comme une phénolase.

La principale caractéristique de ce ferment est de fixer l'oxygène de l'air sur les composés phénoliques. C'est

d'ailleurs, cette propriété et la présence d'un produit à fonction pénolique, le laccol, qui expliquent la formation de la laque à partir des suc d'arbres à laque.

L'action de la laccase se manifeste spécialement sur les diphénols. Gabriel BERTRAND a montré que parmi ceux-ci, les dérivés ortho et para sont plus facilement oxydables que les dérivés méta. Sur les diphénols, l'action de la laccase donne, réactions secondaires mises à part, des quinones.

L'hydroquinone se transforme en quinone.

Le pyrogallol, donne par oxydation un composé jaune clair, puis un précipité cristallin de purpurogalline.

Le gaïacol donne de la tétragaïaquinone dont la constitution a été établie par G. BERTRAND ; puis BOURQUELOT [24] en étudiant le processus général d'oxydation par la laccase des champignons. et les élèves de BOURQUELOT, HÉRISSEY et DOBY ont montré que les corps oxydables sont transformés en molécules doubles, un carbone d'une molécule se trouve relié au carbone de l'autre par enlèvement d'un H à chacun des deux noyaux, les fonctions phénol restant libres en totalité ou en partie.

En résumé la laccase est susceptible de produire de nombreuses réactions d'oxydation, et elle possède une affinité toute particulière pour les dérivés phénoliques. C'est justement cette propriété spéciale qui a servi à de nombreux auteurs pour mesurer l'activité de cette diastase oxydante.

III. — La laccase est-elle une diastase ?

Elle en possède toutes les propriétés sans exception : activité catalytique, se traduisant par une disproportion très marquée entre la cause et l'effet produit. Précipitabilité par l'alcool, l'acétone, sensibilité à l'action de la chaleur, optimum d'activité en fonction du pH.

a) *Précipitation par l'alcool, l'acétone.* — La laccase est précipitée par l'alcool ou l'acétone, ou tout au moins elle est adsorbée par le précipité qui se forme lorsque on ajoute de l'alcool ou de l'acétone à une préparation de laccase.

Dans certaines conditions, ce précipité recueilli, dissous dans l'eau, possède une activité sensiblement égale à la préparation primitive.

b) *Action de la chaleur.* — L'action de la chaleur sur les préparations diastasiques a été longtemps considérée comme le meilleur critère de l'existence des diastases. Les diastases sont généralement sensibles à l'action de la température. Soumise à la température de 100° pendant un temps plus ou moins long, elles sont généralement détruites. G. BERTRAND [22] a étudié l'action de la chaleur sur des préparations de laccase. C'est grâce à cet agent physique, qu'il a pu séparer la tyrosinase de la laccase d'une macération de *Russule*. En chauffant au bain-marie à 50°, 60° et même 70°, la tyrosinase est complètement détruite, alors que la laccase est peu altérée par un chauffage de 15 minutes au bain-marie à 70°.

SUMINOKURA [99] a étudié l'action de la chaleur sur des sucres de laque du Japon. Jusqu'à 40°, la laccase s'altère peu, même pendant un chauffage d'une heure ; à 50° sa destruction est partielle et elle est complète à 75°.

Nous avons étudié, de notre côté, l'action de la chaleur sur le suc d'arbre à laque. La laccase se montre très sensible à l'action de la chaleur. Nous avons fait des essais à diverses températures et pendant des temps plus ou moins longs, en plaçant nos tubes à essais, renfermant les préparations de laccase, dans un vase rempli d'eau, lui-même plongé dans un bain-marie, et constamment agité.

Voici nos résultats :

Température	Activité :			
	chauffage de 5 minutes	chauffage de 10 minutes	chauffage de 15 minutes	chauffage de 20 minutes
30°	100	100	100	100
50°	90	88	82	80
65°	10	7	4	0
75°	0	0	0	0
100°	0	0	0	0

Les chiffres donnés dans ce tableau, indiquent l'activité pour cent retrouvée après l'action de la chaleur poursuivie pendant des laps de temps déterminés, on voit qu'un chauffage de 20 minutes à 65°, suffit à détruire la laccase et qu'un chauffage de 5 minutes à 75° conduit au même résultat.

Contrairement aux données de G. BERTRAND pour la laccase de Russule, nous voyons que la laccase du suc que nous avons à notre disposition s'est montrée très sensible à l'action de la chaleur.

Au cours de ces expériences, nous avons eu l'occasion d'observer un phénomène intéressant, qui a été d'ailleurs signalé par d'autres auteurs, entr'autres par G. BERTRAND [22] à propos de la sucrase. MIYAKE et ITO [83 bis] ont montré que l'amylase d'*aspergillus* partiellement inactivée par chauffage récupère peu à peu à la température ordinaire son activité disparue. Une préparation de laccase inactivée par la chaleur, récupère à la température ordinaire, et en fonction du temps une partie de son activité. Ce phénomène est d'autant plus appréciable, que la laccase a été inactivée à plus basse température. C'est ainsi qu'au bout de 24 heures, les préparations chauffées pendant 20 minutes à 65° et 5

minutes à 75°, totalement inactivées, sont redevenues actives. La préparation chauffée 20 minutes à 65° est beaucoup plus active que celle chauffée 5 minutes à 75° et celle-ci plus active encore que celle chauffée 5 minutes à 100°. Toutefois cette régénération d'activité ne dépasse pas 5 pour 100 de l'activité primitive.

On peut interpréter ce fait, en assimilant l'inactivation de la laccase à la coagulation réversible d'un colloïde. On sait par exemple que l'albumine précipitée par l'alcool est immédiatement soluble dans l'eau, tandis qu'un contact prolongé avec l'alcool la rend insoluble. Nous avons aussi étudié l'action de la chaleur sur l'activité de la laccase en fonction du pH, à un pH acide voisin de 4,5, la laccase est détruite en 15 minutes à 65°, tandis qu'en milieu alcalin elle est plus rapidement détruite ; à pH 8,5, elle est complètement inactivée par un chauffage de 10 minutes à 65°.

En résumé, la laccase se montre sensible, comme tous les autres ferments à l'action de la chaleur.

c) *Existence d'un optimum de réaction.* — Comme tous les autres ferments, la laccase possède un optimum d'activité en fonction de la réaction du milieu.

P. FLEURY a montré que l'optimum de réaction est à pH 6,7 dans des conditions expérimentales déterminées. L'activité presque nulle à pH = 4,5 croît jusqu'à pH = 6,7 et redevient nulle à pH = 9,0.

SUMINOKURA, en opérant avec une laccase de suc du Japon et dans des conditions expérimentales différentes de celles de P. FLEURY a trouvé un optimum d'activité à pH = 6,0 et une activité nulle à pH = 8,0. La courbe d'activité en fonction du pH de SUMINOKURA est légèrement déplacée du côté acide par rapport à celle de P. FLEURY.

La présence d'un optimum d'activité en fonction de la réaction du milieu est un des meilleurs critères de l'existence des diastases.

Tels sont les principaux critères qui nous permettent d'admettre que la laccase est une diastase.

IV. Précautions à prendre pour mesurer l'activité de la laccase.

Nous avons vu dans la première partie la technique permettant de mesurer l'activité de la laccase.

Nous allons donner ici les précautions que nous prenons lorsque nous faisons des déterminations en série de l'activité de la laccase.

Il est nécessaire d'avoir un matériel excessivement propre et nous dirons même stérile. Tout appareil qui a été en contact avec une préparation fermentaire doit être stérilisé, c'est-à-dire placé dans l'eau bouillante pendant un quart d'heure, pour détruire toutes traces de laccase.

V. — Conservation des préparations diastasiques.

Dans toutes nos recherches, nos mesures d'activité sont faites immédiatement après chaque manipulation. Cependant il est parfois nécessaire de conserver aussi intacts que possible nos sucres d'arbre à laque, dans des flacons bien remplis, bien bouchés, à l'abri de la lumière et placés dans un endroit frais, dans ces conditions l'activité des sucres ne varie presque pas.

Nous avons fait des expériences, portant sur l'action des basses températures sur l'activité. Quatre flacons d'une même préparation diastatique, incomplètement remplis, sont mis en expériences. Deux flacons sont placés à la glacière, l'un d'entre eux étant souvent ramené à la température ordinaire, et replacé ensuite à la glacière (froid discontinu), le troisième est conservé à la cave, et le quatrième à la température du laboratoire.

L'activité varie peu pour les flacons conservés à la glacière et à la cave, elle varie pour les deux autres, com-

me le montre le tableau qui résume toutes nos expériences.

Jours	Activité :			
	froid continu	froid discontinu	laboratoire	cave
1 ^{er}	4,3	4,3	4,3	4,3
8 ^e	4,3	3,9	4,0	4,3
15 ^e	4,1	2,9	2,8	4,1
40 ^e	4,0	0	0,96	4,1

Méthodes de purification de la laccase.

En possession de techniques éprouvées pour la mesure de l'activité de la laccase pour le dosage du fer et du manganèse, nous pouvons aborder l'étude de la purification des préparations de laccase qui constitue l'objet essentiel de notre travail ; il s'agit de choisir une ou plusieurs méthodes de purification fournissant des préparations aussi actives et aussi pures que possible, et de suivre au cours de cette purification le sort du manganèse et du fer.

Nous avons examiné les méthodes suivantes :

- 1° Précipitation.
- 2° Dialyse.
- 3° Ultrafiltration.
- 4° Adsorption.

A notre grand regret des considérations d'ordre matériel ne nous ont pas permis d'étudier une méthode cependant importante, l'électrodialyse, qui aurait peut-être fourni des résultats intéressants.

Il importe d'abord de préciser comment nous entendons apprécier l'efficacité des méthodes de purification et suivre l'enrichissement de nos préparations.

Les données expérimentales qui nous ont paru nécessaires de déterminer sont :

- 1° Le pouvoir diastasique de nos diverses solutions.
- 2° L'extrait sec.
- 3° Les cendres.
- 4° La teneur en manganèse.
- 5° La teneur en fer.

L'application des méthodes de purification doit être menée de façon à ne pas produire une trop grande perte d'activité : on sait que plus une diastase est purifiée, plus elle devient fragile.

Pour apprécier le degré de purification de nos préparations diastasiques, nous avons naturellement soin de rapporter leur activité au résidu sec, car de deux préparations diastasiques ayant la même activité, la plus pure est celle qui fournit le moins d'extrait sec. Au cours d'une purification le rapport $\frac{\text{activité}}{\text{extrait sec}}$ doit donc augmenter.

Suc. — Nous appelons suc, le Nuoc'Son, c'est-à-dire le suc d'arbre à laque, plus ou moins dilué pour la commodité des manipulations.

Activité diastasique. — Elle est mesurée suivant la technique précédemment décrite.

Extrait sec. — L'extrait sec est obtenu en soumettant un volume variable (2 à 10 cm³) de nos préparations diastasiques à l'action du vide sulfurique. Pression 8 à 10 mm. de mercure pendant une semaine de façon à obtenir un résidu sec d'au moins 0 g.,100.

Cendres sulfatées. — L'extrait est calciné au four à moufle. Les cendres obtenues sont traitées par l'acide sulfurique, calcinées à nouveau jusqu'à ce qu'il ne se dégage plus de fumées blanches. Après refroidissement on pèse. C'est ce que nous appelons les cendres sulfatées.

Fer et manganèse. — Ils seront dosés suivant les techniques déjà décrites.

Mode d'expression et de présentation des résultats.

1° Définition de l'unité diastasique U. D.

Les résultats de nos mesures de vitesse des réactions diastasiques, déterminées selon la technique rappelée plus haut, seront exprimés en unités diastasiques U. D.

Nous disons qu'un volume déterminé de solution contient une unité diastasique U. D. lorsque ce volume est susceptible de produire aux dépens de 10 cm³ d'une solu-

tion de gaïacol à 1 p. 100, 1 mg. de tétragaïacoquinone en 10 minutes à $\text{pH} = 6,7$ et à $+ 30^\circ$.

Par exemple si nous indiquons que 350 cm^3 d'une solution contiennent 1575 unités diastasiques U. D., cela veut dire qu'un volume convenable soit $0 \text{ cm}^3,2$ de cette solution agissant dans les conditions précisées ci-dessus sur 10 cm^3 de solution de gaïacol a produit $0 \text{ mg},9$ de gaïacoquinone ce qui pour 350 cm^3 représente 1575 mg. de gaïacoquinone en 10 minutes à $+ 30^\circ$ et à $\text{pH} = 6,7$.

2° Définition de la concentration diastasiqne C. D.

C'est le nombre d'unités diastasiques contenues dans 100 cm^3 de solution.

Dans l'exemple précédent C. D. $= \frac{1575}{350} \times 100 = 450$.

3° Définition de l'activité diastasiqne A. D.

C'est le nombre d'unités diastasiques U. D. contenues dans 1 g. d'extrait sec. Comme d'ordinaire, nous exprimons nos extraits secs E en g. pour 100 cm^3 de solution diastasiqne, l'activité diastasiqne A. D. sera exprimée par la valeur du rapport.

$$\frac{\text{Concentration diastasiqne C. D.}}{\text{Extrait sec (en g. pour } 100 \text{ cm}^3\text{)}} \checkmark$$

Dans l'exemple précédent si E extrait sec pour 100 cm^3 est de 0,255, l'activité A. D. sera $\frac{450}{0,255} = 1.765 \text{ cm}^3$ ce qui veut dire, en somme que 1 g. de l'extrait sec de notre solution prise comme exemple correspond à 1.765 U. D. et serait donc capable de donner dans les conditions rappelées lors de la définition de l'U. D. 1.750 mg. de gaïacoquinone.

4° Définition du titre en manganèse T. Mn ou en T Fe de la diastase.

C'est en principe le poids de manganèse ou de fer (exprimé en millièmes de mg. γ (contenus) dans le produit correspondant à une unité diastasiqne U. D.

Nous obtenons cette valeur, en général, en déterminant le manganèse (exprimé en γ dans 100 cm³ de solution diastatique) ce qui nous donne la concentration en Mn (CMn) et en rapportant ce chiffre à la concentration diastatique C. D. soit $\frac{C.Mn}{CD} = T \text{ Mn en } \gamma$.

Le titre en fer est défini de la même façon.

CHAPITRE I.

Méthodes de précipitation.

L'entraînement des diastases par certains précipités formés au sein des milieux biologiques complexes, a été le premier mode d'isolement des diastases et il en est resté longtemps le principal.

Toutefois il est assez difficile d'obtenir une bonne purification par simple précipitation, à tel point que de nombreux auteurs considèrent la purification des diastases par précipitation comme une méthode désuète. Nous verrons cependant qu'il est possible d'avoir de bons résultats, en associant divers moyens de précipitation.

On a utilisé pour la purification des préparations diastasiques, un grand nombre de réactifs précipitants des sels de métaux lourds : bichlorure de mercure, acétate de plomb, acétate d'urane, des solvants organiques : alcool, acétone, et plus rarement des sels neutres : sulfate d'ammonium, sulfate de magnésium.

Généralement, ces réactifs, lorsqu'ils sont utilisés en quantité suffisante, donnent des précipités contenant toute la substance active.

Pour la purification de la laccase, nous avons choisi comme réactifs précipitants d'une part l'alcool et l'acétone et d'autre par le sulfate d'ammonium.

Nous rangeons également dans ce chapitre l'étude de l'action du carbonate neutre de sodium. Ce réactif provoque dans le suc de l'arbre à laque un abondant précipité, qui à l'inverse de ce qui se produit avec l'alcool.

l'acétone ou le sulfate d'ammonium n'entraîne pas la laccase.

L'utilisation de ce réactif nous conduit donc aussi à une purification de la laccase, mais par un mécanisme opposé à celui des corps précédents.

Nous exposerons successivement les résultats obtenus au moyen de ces différents réactifs.

I. — Précipitation par l'alcool et par l'acétone.

La précipitation d'une préparation diastasique par l'alcool est la méthode de purification la plus anciennement connue. PAYEN et PERSOZ en 1833, ont pu réaliser la découverte de la « diastase » de l'orge germé, en précipitant leur préparation diastasique par l'alcool.

Depuis cette époque, la plupart des préparations diastatiques ont été obtenues par précipitation alcoolique. On considère d'ailleurs cette opération plutôt comme une méthode de préparation des diastases que comme une méthode de purification. Gabriel BERTRAND prépare sa laccase par précipitation du suc de laque par l'alcool. La méthode de préparation de l'émulsine la plus usitée, consiste à précipiter cette diastase par l'alcool après avoir éliminé les protéines végétales par l'acide acétique.

WILLSTÄTTER a utilisé pour ses recherches sur l'invertine, l'acétone, (qui d'après cet auteur, est moins nocive que l'alcool) ainsi que l'alcool-éther.

Les proportions d'alcool à utiliser sont généralement très grandes. Sur nos préparations de laccase, nous obtenons un début de précipitation lorsque la quantité d'alcool à 96° est de 2 volumes pour 1 volume de suc diastasique, la précipitation est complète lorsqu'on utilise 5 volumes d'alcool, pour 1 volume de la préparation de laccase.

L'acétone, semble être un réactif plus puissant, puisqu'elle commence à précipiter nos préparations à partir de 1 volume pour trois volumes de notre préparation diastasique.

La précipitation est complète lorsque, pour 1 volume de notre préparation nous ajoutons 3 volumes d'acétone.

A. Action de l'alcool et de l'acétone sur la laccase.

Si l'on prend quelques précautions, l'alcool et l'acétone n'ont aucune action sensible sur l'activité de la laccase.

Les précipités obtenus à *froid* par l'un de ces deux réactifs, ramenés *rapidement* par addition d'eau au volume initial après élimination de l'alcool ou de l'acétone, posèdent à 5 p. 100 près, la même activité diastatique que le suc mis en œuvre.

WILLSTÄTTER et SCHNEIDER [117] signalent d'autre part que la sucrase et la plupart des diastases ne sont pas très sensibles à l'action de l'alcool et encore moins à celle de l'acétone. C'est seulement lorsque leur purification est très avancée qu'elles deviennent sensibles à ces réactifs. Dans les préparations impures la diastase semble être protégée par les substances étrangères qui l'accompagnent. D'ailleurs certains auteurs laissent le précipité actif en contact avec l'alcool pendant un temps plus ou moins long. O. SULLIVAN et F. N. TOMPSON [98] laissent le précipité formé à partir de leur autolysat de levure en contact avec l'alcool pendant trente heures.

B. Purification de la laccase par l'alcool et l'acétone.

La purification de la laccase par précipitation alcoolique ou acétonique, ne nous a pas donné de bons résultats, tout au moins pour le but que nous poursuivions. L'alcool ou l'acétone utilisés en grandes proportions précipitent toute la laccase ainsi que la majeure partie des substances étrangères qui l'accompagnent, de sorte que l'activité de la préparation n'est pas augmentée, l'extract sec, les cendres sulfatées, la teneur en fer et en manganèse, n'ont pas diminué.

Les résultats sont sensiblement les mêmes si l'on fait des précipitations fractionnées de la laccase à l'aide de faibles quantités d'alcool ou d'acétone.

Cependant comme nous le verrons plus loin, au chapitre de l'adsorption, cette purification par l'alcool ou par l'acétone nous permettra de réaliser directement des adsorptions de la laccase ; alors qu'elles sont impossibles sans ce traitement préalable.

Nous allons exposer dans ce chapitre, nos divers essais de précipitation de la laccase, par l'alcool ou par l'acétone, ils ont été de deux sortes.

1° Précipitation complète.

2° Précipitations fractionnées.

C. Technique de la précipitation.

Toutes nos précipitations, soit par l'alcool, soit par l'acétone, sont faites à froid. — L'alcool ou l'acétone maintenus pendant un quart d'heure dans un mélange de glace et de sel, sont versés d'un seul coup, dans la préparation diastasique également refroidie vers 0 degré. Le tout, après agitation, est rapidement centrifugé. Le liquide et le précipité ainsi obtenus sont séparés et chacun d'eux est transvasé quantitativement dans un cristalliseur. L'alcool ou l'acétone sont éliminés par le vide sulfurique, opération qui demande trois à quatre heures.

Lorsque l'alcool ou l'acétone est complètement éliminé on ramène avec de l'eau distillée le liquide et le précipité au volume primitif et on détermine la concentration diastasique, l'extrait sec, les cendres sulfatées, le fer et le manganèse du précipité et du liquide surnageant.

D. Précipitation de la laccase par de grandes quantités d'acétone ou d'alcool.

Voici un essai de précipitation :

Préparation diastasique.....	une partie
Acétone.....	deux parties

La précipitation est réalisée suivant la technique précédente.

Voici nos résultats, ramenés à 100 cm³ de suc (1).

	C. D. U. D. p. 100 cm ³	Extrait sec en g. p. 100	Cendres sulfatées en g. p. 100	Manganèse en mg. p. 100	Acidité C. D. extrait sec	T. Mn Mn en γ U. D.
Suc avant tout traitement...	6,650	22,50	2,15	30	295	100
Précipité ramené au volume primitif par addition d'eau.	6,600	18,350	1,750	25,5	360	70
Liquide ramené au volume primitif.....	0	2,50	0,250	4	—	—
Liquide + précipité ramenés au volume primitif et à parties égales.	6,500	—	—	—	—	—

Suc d'arbre à laque..... une partie
 Acétone cinq parties.

après centrifugation, le précipité obtenu et repris par
une partie d'eau, est précipité à nouveau par 5 parties
d'acétone.

Voici nos résultats : (1)

	C. D.	Extrait sec en g. p. 100	Cendres sulfatées en g. p. 100	Manganèse en mg. p. 100	Fer en mg. p. 100	Azote en mg. p. 100	Activité C. D. extrait sec	T. M. Mn en γ U. D.
Suc avant tout traite- ment	7,200	20,6	2,10	30	2	89,6	349	857
Précipité ramené au volume primitif	6,950	16,9	1,510	23,7	2	75,6	411	566

Des précipitations avec l'alcool nous ont donné des
résultats analogues et nous croyons inutile de reproduire
ces expériences.

(1) Pour la signification des abréviations voir pages 69 et 70.

On voit d'après ces deux tableaux que la précipitation n'a pas amené de fractionnement sensible puisque l'activité (C. D extrait sec) d'après le tableau I passe seulement de 295 à 360 et d'après le tableau II de 349 à 411.

L'extrait sec et la teneur en manganèse ont diminué environ de 20 p. 100, la teneur en azote a baissé de 15 p. 100.

L'activité du suc est restée sensiblement la même.

E. Précipitation de la laccase par de petites quantités d'alcool ou d'acétone.

PRÉSENCE DE SUBSTANCES INHIBITRICES.

Dans les essais qui suivent, notre but a été un peu différent de celui que nous nous sommes proposés au début de notre travail. Au lieu de chercher une bonne purification de la laccase nous avons cherché s'il y avait une certaine proportionnalité entre l'activité de la laccase et sa teneur en fer et en manganèse. — Dans ce but nous avons fait subir à nos préparations diastasiques, des précipitations avec des quantités d'alcool ou d'acétone généralement inférieures au volume de la préparation diastatique utilisée, de façon à obtenir à la fois un précipité actif et un liquide actif, dans lesquels nous avons évalué l'activité, le taux en extrait sec et en cendres sulfatées, et dosé le fer et le manganèse.

Les proportions d'alcool ou d'acétone utilisées pour ces précipitations ont été :

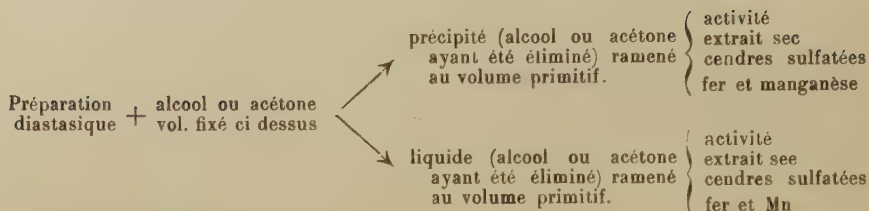
A. — *Pour l'alcool à 96°.*

- 1° 1 volume de suc et 1 volume d'alcool.
- 2° 1 volume de suc et $\frac{3}{4}$ de volume d'alcool.
- 3° 1 volume de suc et $\frac{2}{3}$ de volume d'alcool.

B. — *Pour l'acétone.*

- 1° 1 volume de suc et 1 volume d'acétone.
- 2° 1 volume de suc et $\frac{3}{4}$ de volume d'acétone.
- 3° 1 volume de suc et $\frac{1}{2}$ volume d'acétone.

Voici le schéma de ces précipitations :



Toutes ces précipitations sont faites à basse température, et l'alcool ou l'acétone sont éliminés comme précédemment.

Les déterminations d'activité ont été faites selon la technique indiquée, mais de plus nous avons cherché à mettre en évidence l'influence inhibitrice de certaines impuretés, en déterminant par exemple l'activité d'un précipité après addition du liquide actif résultant de la précipitation, ce liquide ayant été inactivé au préalable par la chaleur, et inversement, l'activité du liquide additionné du précipité préalablement inactivé par la chaleur.

Nous ne donnerons que les résultats obtenus par une précipitation alcoolique et une précipitation acétonique.

Précipitation alcoolique { suc..... 1 volume.
alcool à 95° 3/4 de volume.

	C. D.	Extrait sec en g. p. 100	Cendres sulfatées en g. p. 100 cm ³	Fer en mg. p. 100 cm ³	Manganèse en mg. p. 100 cm ³	Activité/C. D. extrait sec	Titre en Mn Mn en γ activité O. D.
100 cm ³ de suc.....	6,500	38,02	4,4	39,0	69,0	171,0	10,6
Précipité alcoolique	4,900	28,2	2,90	27,0	45,0	175,0	9,1
Liquide surnageant.....	1,200	9,5	1,40	15,0	22,0	126,0	18,3
Précipité + liquide inactivé.	4,900	—	—	—	—	—	—
Liquide + précipité inactivé.	950	—	—	—	—	—	—
Liquide + précipité	5,900	—	—	—	—	—	—

Précipitation acétonique..... { suc..... 1 volume.
acétone..... 3/4 de volume.

	C. D.	Extrait sec en g. p. 100 cm ³	Cendres sulfatées en g. p. 100 cm ³	Fer en mg. p. 100 cm ³	Manganèse en mg. p. 100 cm ³	Activité/ C. D. extrait sec	Titre en Mn Mn en γ activité U. D
100 cm ³ de suc.....	4,500	35,1	4,7	37	57	128,5	12,6
Précipité cétonique.....	3,100	27,5	3,50	25	38,1	112,7	12,2
Liquide surnageant	530	7,3	1,10	11	20,2	72,6	38,1
Précipité + liquide inactivé.	3,200	—	—	—	—	—	—
Liquide + précipité inactivé.	450	—	—	—	—	—	—
Liquide + précipité.....	4,100	—	—	—	—	—	—

CONCLUSIONS.

La précipitation alcoolique ou acétonique n'est pas susceptible de nous fournir une bonne purification de nos préparations diastasiques ainsi que le montre l'examen de l'activité A. D $\left(\frac{\text{C. D.}}{\text{extrait sec}}\right)$ qui, dans le cas de l'alcool, ne passe que de 171 à 175 et dans le cas de l'acétone diminue et passe de 128 à 112.

Le manganèse semble suivre l'activité, c'est ce qu'avait déjà constaté G. BERTRAND dans ses précipitations alcoolique de la laccase.

II. — Précipitation par le carbonate de sodium.

Au cours d'expériences destinées à faire subir des variations de pH, à nos préparations diastasiques, nous avons constaté que le carbonate de sodium utilisé en proportions convenables fournissait avec ces préparations un précipité volumineux. A l'inverse des précipitations alcooliques et acétoniques qui donnent des précipités actifs, le carbonate de sodium précipite des substances inactives, et seul, le liquide surnageant reste actif.

Le carbonate de sodium semble agir par conséquent dans ce cas particulier, comme un véritable réactif déféquant.

Nous avons jugé intéressant d'étudier cette méthode de purification.

A. Technique de la précipitation.

Après de nombreux essais portant sur la concentration et les proportions de carbonate de sodium à utiliser, pour obtenir un maximum de précipitation, sans trop modifier l'activité de la laccase ; nous avons choisi la solution normale de carbonate de sodium (CO_3Na_2 10 H_2O) à 143 grammes pour 1.000, qui est ajoutée à un volume égal de suc d'arbre à laque (1).

La précipitation est faite à froid d'après la technique suivante :

Suc d'arbre à laque	I Volume.
Solution de $\text{CO}_3 \text{Na}_2 \text{N}$	I Volume.

La solution de carbonate de sodium est maintenue pendant 10 minutes dans un mélange réfrigérant glace

(1) D'après les renseignements qui nous ont été aimablement fournis par des chercheurs qui ont utilisé notre technique, cette proportion ne vaut que pour le suc que nous avons étudié. Il importe pour chaque nouvel échantillon de suc de laque de déterminer le volume optimum de solution de carbonate de sodium.

et sel, ajoutée d'un seul coup au suc diastasique, également refroidi pendant 10 minutes dans de la glace fondante ; après une agitation énergique, il se forme un abondant précipité brunâtre. Une centrifugation rapide permet d'obtenir un liquide qui se sépare parfaitement du précipité.

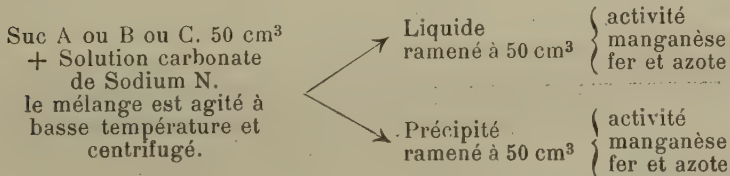
A. Liquide. — Le liquide ainsi obtenu, est limpide, d'une coloration jaune brunâtre.

Son pH est voisin de 9,2 — Il renferme un excès de carbonate de sodium et de ce fait la teneur en extrait sec et en cendres sulfatées est notablement augmentée.

B. Précipité. — Le précipité obtenu, se rassemble bien par centrifugation ce qui permet une décantation facile. Sa coloration est brun noirâtre. Il est pratiquement inactif. Il contient une partie des impuretés qui accompagnent la laccase.

B. Etude de l'action du carbonate de sodium sur le suc de l'arbre à laque.

Nous avons étudié la répartition de l'activité, du manganèse, du fer et de l'azote dans le liquide, et le précipité, obtenu par l'action du carbonate sur des préparations de la laccase. Nos essais ont porté sur trois échantillons A.B.C. de suc de l'arbre à laque, d'origines différentes.



Remarque. — La concentration diastasique est déterminée selon la technique indiquée précédemment. La solution diastasique obtenue après action du carbonate

de sodium est ramenée par des solutions tampons au pH optimum de 6,7. — Les dosages du manganèse, du fer et de l'azote, ne présentent aucune difficulté. Cependant la préparation des cendres sulfatées est un peu plus difficile, du fait de la présence d'un excès de carbonate de sodium. Lors de la calcination de l'extrait sec, celui-ci gonfle, se boursouffle, forme un véritable champignon charbonneux, qui tend à sortir de la capsule. Il faut prendre la précaution d'utiliser des capsules d'une capacité suffisante. On peut aussi décomposer le carbonate de sodium en excès par l'acide chlorhydrique, évaporer à sec au bain marie et calciner ensuite, en opérant comme précédemment.

Voici les résultats de ces trois essais :

	Concentration diastatique C. D.	Manganèse en mg. p. 100 cm ³	Fer en mg. p. 100 cm ³	Azote en mg. p. 100 cm ³	Titre en Mn en γ
Suc A 50 cm ³ + H ₂ O 50 cm ³	367	16,8	8,3	89,6	44,9
Suc A : 50 cm³ + Sol. Co₃Na₂ N. 50 cm³ $\begin{cases} \nearrow \text{liq. ramené à 100 cm}^3 \\ \searrow \text{préc. ramené à 100 cm}^3 \end{cases}$	305	1,6	1,4	35,8	5,2
	12	14,9	7,3	51,9	12,40
Suc B 50 cm ³ + H ₂ O 50 cm ³	1375	48,5	12,7	98,1	35,3
Suc B : 50 cm³ + Sol. Co₃Na₂ N. 50 cm³ $\begin{cases} \nearrow \text{liq. ramené à 100 cm}^3 \\ \searrow \text{préc. ramené à 100 cm}^3 \end{cases}$	1113	5,7	3,4	36,7	
	0	43,2	9,05	60,5	1
Suc C 50 cm ³ + H ₂ O 50 cm ³	4850	61,2	16,3	96,3	12,6
Suc C : 50 cm³ + Sol. Co₃Na₂ N. 50 cm³ $\begin{cases} \nearrow \text{liq. ramené à 100 cm}^3 \\ \searrow \text{préc. ramené à 100 cm}^3 \end{cases}$	3880	8,9	5,7	32,8	
	0	52,9	11,3	62,3	

On voit d'après les chiffres obtenus que seul, le liquide surnageant est actif, et que la perte en activité ne dépasse pas 20 p. 100. Nous ne pouvons pas déterminer l'activité, c'est-à-dire le rapport

C. D. (concentration diastasique)
extrait sec

puisque ce liquide renferme un grand excès de carbonate de sodium qui augmente la teneur en extrait sec, néanmoins nous avons éliminé une quantité importante d'impuretés, ainsi que le prouve la teneur en extrait sec du précipité inactif.

Par contre, la teneur en manganèse du liquide diminue d'une façon extrêmement marquée.

Voici d'autres essais de précipitations par le carbonate de sodium, effectués sur divers échantillons de suc.

Les déterminations de l'activité, du manganèse, du fer et de l'azote n'a été faite que sur le liquide carbonaté, qui est seul actif.

Après précipitation carbonatée du suc, volume à volume, le liquide séparé par centrifugation du précipité est ramené par addition d'eau au volume primitif, ce qui représente en somme le suc dilué au demi ; si nous avons utilisé 50 cm³ de suc et 50 cm³ de solution normale de carbonate de sodium, le liquide carbonaté séparé du précipité est ramené à 100 cm³ par addition d'eau.

Voici les résultats obtenus : Le tout ramené à 100 cm³ de liquide carbonaté.

	C. D.	Extrait sec en g. p. 100	Cendres sulfatées en g. p. 100	Manganèse en mg. p. 100	Fer en mg. p. 100	Azote en mg. p. 100	Mn U. D.
Suc I dilué au 1/2.	3700	10,3	2,1	38	4	92,9	10,2
Suc I carbonaté...	3010	8,9	3,5	5,9	09	37,9	1,9
Suc II dilué au 1/2.	1250	19,9	2,2	35	50	70	28
Suc II carbonaté..	972	18,70	4,32	2,5	11	4,2	2,5
Suc III dilué au 1/2	666	7,12	0675	12,5	—	—	18,8
Suc III carbonaté.	546	6,74	1,84	0,75	—	—	1,3
Suc IV dilué au 1/2	332	4,32	0520	9,31	—	—	28
Suc IV carbonaté.	248	3,61	1,32	0,62	—	—	2,5
Suc V dilué au 1/2.	2150	11,2	1,9	33,2	—	—	15,4
Suc V carbonaté..	1753	10,8	2,3	6,7	—	—	3,8

C. Action de quantités croissantes de carbonate de sodium sur nos préparations diastasiques.

Au volume constant de suc (5 cm³) nous ajoutons des volumes variables pour chaque expérience de 0 à 5 cm³ de solution normale de carbonate de sodium, et nous complétons chaque fois à 100 cm³ avec de l'eau distillée. Après centrifugation, nous déterminons l'activité et la teneur en manganèse du liquide carbonaté ainsi obtenu. (Dans ces expériences nous ne rétablissons plus l'égalité de volume entre le suc dilué au demi et le liquide carbonaté obtenu par centrifugation).

Voici nos résultats ramenés à 10 cm³ de liquide carbonaté.

	C. D.	Manganèse en mg. p. 100	$\frac{\text{Mn}}{\text{U. D.}}$
Suc A 5 cm ³ + eau q.s.p. 10 cm ³	1550	25,75	16,6
— 5 cm ³ + 1 cm ³ sol. Co ₃ Na ₂ N + eau q.s.p. 10 cm ³	1440	26,25	18,2
— 5 cm ³ + 2 cm ³ sol. Co ₃ Na ₂ N + eau q.s.p. 10 cm ³	1440	25,50	17,7
— 5 cm ³ + 3 cm ³ sol. Co ₃ Na ₂ N + eau q.s.p. 10 cm ³	1440	20,00	14,2
— 5 cm ³ + 5 cm ³ sol. Co ₃ Na ₂ N + eau q.s.p. 10 cm ³	1330	5,00	3,7
Suc B 5 cm ³ + eau q.s.p. 10 cm ³	944	26,50	28
— 5 cm ³ + 1 cm ³ sol. Co ₃ Na ₂ N + eau q.s.p. 10 cm ³	930	24,75	26,7
— 5 cm ³ + 2 cm ³ sol. Co ₃ Na ₂ N + eau q.s.p. 10 cm ³	867	20,25	23,3
— 5 cm ³ + 3 cm ³ sol. Co ₃ Na ₂ N + eau q.s.p. 10 cm ³	867	9,25	10,6
— 5 cm ³ + 5 cm ³ sol. Co ₃ Na ₂ N + eau q.s.p. 10 cm ³	834	1,5	1,7

Ces expériences confirment les précédentes, au fur et à mesure que nous ajoutons du carbonate de sodium nous éliminons de plus en plus du manganèse. — L'activité semble rester la même dans le suc primitif dilué au demi et le suc carbonaté, ce qu'on peut expliquer de la façon suivante : Si d'une part nous avons une perte d'activité d'environ 20 p. 100 par l'action du carbonate de sodium, nous avons d'autre part une concentration de cette activité par le fait de la formation d'un précipité inactif dont le volume représente environ 20 p. 100 du volume primitif, ainsi, si nous partons d'une solution diastasique dont le volume est de 50 cm³, et si nous ajoutons un égal volume de la solution normale de carbonate de sodium, nous obtenons après centrifugation 80 cm³ de liquide carbonaté actif, dont l'activité est égale à celle du liquide diastasique primitif dilué au demi.

D. Autres avantages de la précipitation par le carbonate de sodium.

La purification de la laccase résultant de l'élimination de grandes quantités de manganèse, de fer et d'azote et de substances organiques n'est pas le seul avantage que nous fournisse la précipitation de nos préparations diastatiques par le carbonate de sodium ; cette méthode permet encore de stabiliser ces préparations et nous fournit un moyen commode pour faire varier la réaction du milieu.

a) STABILISATION DE NOS PRÉPARATIONS FERMENTAIRES.

La précipitation par le carbonate de sodium élimine la ou les substances, sur laquelle agit la laccase. Nos sucs, avant tout traitement carbonaté, avaient la propriété de noircir au contact de l'oxygène de l'air, et l'activité diminuait au fur et à mesure que le contact de l'air se prolongeait ; il n'en est plus de même avec nos préparations carbonatées. Au contact de l'air, ces préparations ne changent pas de coloration, même lorsque le pH qui est de 9,2 est ramené dans la zone acide.

L'activité comme nous l'ont montré de nombreuses expériences, semble se maintenir constante, malgré la présence du carbonate de sodium en excès, surtout si l'on prend les précautions habituelles, conservation au frais à l'abri de l'air et de la lumière.

b) VARIATION DE LA RÉACTION DU MILIEU.

D'autre part le traitement de nos préparations diastatiques par le carbonate de sodium nous permet de réaliser facilement des variations de pH, qui nous seront nécessaires pour les essais ultérieurs de purification de la laccase.

La possibilité de faire varier la réaction du milieu est une nécessité lorsqu'on veut réaliser des expériences

d'ultrafiltration et surtout des essais d'adsorption et d'élution.

Nous avons fait subir à notre suc carbonaté (liquide actif après précipitation par le carbonate de sodium) des variations de pH. A cet effet nous avons utilisé soit de l'acide phosphorique dilué au $1/10^e$, soit de l'acide acétique dilué au $1/10^e$.

Par addition de l'un de ces acides au suc carbonaté, nous avons le moyen de faire varier le pH de 9,2 jusqu'à 4,6.

Pour voir si des variations accentuées de pH n'altéraient pas l'activité, nous avons fait les essais suivants :

Des quantités déterminées de suc carbonaté ont été amenées à des pH variés et après quelques minutes, la préparation est ramenée au pH optimum soit 6,7 pour mesurer son activité.

Les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux suivants :

1. — Variations du pH avec l'acide acétique.

	pH obtenu	U. D. p. 100
Suc carbonaté 10 cm ³ + H ₂ O : 2 cm ³ ,5 + acide acétique au $1/10^e$: 0 cm ³	9,1	2.550
Suc carbonaté 10 cm ³ + H ₂ O : 2 cm ³ + acide acétique au $1/10^e$: 0 cm ³ ,5	8,0	2.500
Suc carbonaté 10 cm ³ + H ₂ O : 1 cm ³ ,5 + acide acétique au $1/10^e$: 1 cm ³	6,8	2.450
Suc carbonaté 10 cm ³ + H ₂ O : 1 cm ³ + acide acétique au $1/10^e$: 1 cm ³ ,5	6,0	2.400
Suc carbonaté 10 cm ³ + H ₂ O : 0 cm ³ ,5 + acide acétique au $1/10^e$: 2 cm ³	5,2	2.550
Suc carbonaté 10 cm ³ + H ₂ O : 0 cm ³ + acide acétique au $1/10^e$: 2 cm ³ ,5	4,6	2.500

2. — Variations du pH avec l'acide phosphorique.

	pH obtenu	U. D. p. 100
Suc carbonaté 5 cm ³ + H ₂ O, XII gouttes.....	9,3	1.500
Suc carbonaté 5 cm ³ + acide phosphorique au 1/10 ^e , XII gouttes	5,4	1.430
Suc carbonaté 5 cm ³ + H ₂ O, XV gouttes.....	9,3	1.400
Suc carbonaté 5 cm ³ + acide phosphorique, XV gouttes	4,2	1.366
Suc carbonaté 5 cm ³ + H ₂ O, V gouttes	9,3	1.230
Suc carbonaté 5 cm ³ + acide phosphorique au 1/10 ^e , V gouttes.....	6,3	1.166

D'après ces résultats les variations de pH auxquelles on soumet au préalable la laccase n'ont pratiquement aucune action sur l'activité de cette diastase ce qui confirme les résultats obtenus par P. FLEURY.

CONCLUSIONS.

La précipitation de nos préparations diastasiques par le carbonate de sodium nous permet une purification très importante de la laccase. Elle élimine une grande quantité de substances étrangères. Naturellement le taux d'extrait sec et celui des cendres sulfatées n'est cependant pas diminué cela tient à ce que les sucs ainsi traités renferment un excès de carbonate de sodium, qu'il sera d'ailleurs facile d'éliminer par dialyse ou ultrafiltration.

L'activité de la laccase ne semble pas se ressentir de ce traitement brutal.

Mais le fait le plus important est l'élimination de grandes quantités de fer, d'azote et surtout de très notables

quantités de manganèse, environ 85 à 95 p. 100 du manganèse primitif.

Le liquide obtenu se prête facilement aux variations de pH par addition de quantités convenables d'acide phosphorique ou acétique, et sans dommage pour l'activité de la laccase. Comme nous le verrons plus loin, le suc carbonaté dialysé nous permettra de réaliser des adsorptions complètes de la laccase.

III. — Précipitation par un sel neutre : sulfate d'ammonium.

La purification de nos préparations diastasiques par un sel neutre est le dernier essai de la méthode de précipitation, que nous avons utilisé dans notre travail.

La précipitation des diastases par les sels neutres est directement calquée sur la précipitation des protéines dans les milieux biologiques.

Cependant, en ce qui concerne les diastases, le choix du sel neutre à utiliser, pour réaliser la précipitation doit être fait d'une façon judicieuse, car les électrolytes ont sur l'activité des diastases une action considérable et complexe, qui se traduit soit par une exaltation de l'activité ce qui est rare, soit le plus souvent par une diminution.

C'est ainsi que le chlorure de sodium ne peut être utilisé car ce sel se montre fortement nuisible pour la lac-case comme l'a montré P. FLEURY [46].

Les sulfates alcalins, n'ont aucune action sur l'activité ; il en est de même du sulfate d'ammonium.

Parmi tous ces sels neutres, nous avons choisi le sulfate d'ammonium, car celui-ci présente sur tous les autres, l'avantage d'être volatil ; il est donc facile à éliminer par calcination, ce qui est précieux lorsqu'on ne veut pas introduire d'éléments étrangers dans les cendres des préparations examinées.

Au moment où ces recherches ont débutées, le sulfate d'ammonium venait d'être utilisé par NORTHROP et KUNITZ [84] et l'emploi de ce sel leur avait permis d'obtenir la trypsine cristallisée. Depuis cette époque, ces mêmes auteurs et d'autres chercheurs ont généralisé leur technique. P. FLEURY [44 bis].

Etude et technique de la précipitation par le sulfate d'ammonium.

Nous effectuons la précipitation par le sulfate d'ammonium à saturation, sans chercher à opérer un fractionnement comme nous l'avons fait pour nos préparations alcooliques et acétoniques, et comme on le fait habituellement pour les protéines dans les milieux biologiques.

Pour faire cette précipitation, au lieu de saturer nos préparations de laccase de sulfate d'ammonium cristallisé, nous avons préféré, préparer à part une solution saturée de sulfate d'ammonium (70 g. de sulfate d'ammonium cristallisé et 100 cm³ d'eau) à la température ordinaire et utiliser de grandes proportions de cette solution saturée, pour de petites quantités de préparations de laccase. La précipitation est faite à basse température, 0° environ.

La technique choisie pour la précipitation est la suivante :

- 1° Préparation de la laccase..... une partie.
- 2° Solution saturée à 16° de sulfate d'ammonium. dix parties

On verse la préparation de laccase, préalablement maintenue dans la glacière pendant 1 heure, dans la solution saturée de sulfate d'ammoniaque également refroidie (2 à 3 heures à 0°).

On laisse la précipitation se faire à la glacière.

On obtient ainsi un précipité brunâtre, se déposant difficilement à cause de la densité du liquide, mais facile à recueillir sur un filtre sans plis. Une propriété intéressante de ce précipité est sa grande solubilité dans l'eau. Cette propriété sera utilisée plus tard, pour réaliser la concentration de la laccase, en dissolvant le précipité dans la plus petite quantité d'eau possible.

Précipitation. — Nos premiers essais de précipitation ont porté sur le suc (Nuoc' Son) plus ou moins dilué. La précipitation effectuée d'après la technique indiquée ci-

dessus, ne nous a pas donné de bons résultats ; elle est incomplète et de longue durée, de sorte que nous avons abandonné l'action directe du sulfate d'ammonium sur le suc lui-même.

Nos investigations ont porté sur le suc purifié par précipitation au carbonate de sodium avec lequel nous avons obtenu des résultats satisfaisants.

Notre première intention était d'obtenir une précipitation intégrale de la laccase, par le sulfate d'ammonium.

Nous avons alors effectué diverses expériences pour étudier la précipitation en fonction du temps et en fonction de la réaction du milieu, de façon à fixer les conditions les plus avantageuses au point de vue pratique.

Expérience A. — Dans une première expérience nous avons simplement étudié la précipitation de la laccase par le sulfate d'ammonium en fonction du temps.

Voici la technique utilisée.

Expérience A.

Un volume de suc carbonaté (Nuoc' Son traité par son volume de solution normale de carbonate de sodium) on ajoute 10 volumes d'une solution saturée de sulfate d'ammonium. La précipitation est effectuée à la glacière pendant une journée, le précipité obtenu est recueilli sur un filtre sans plis, et ramené par dissolution dans l'eau, au même volume que le suc carbonaté primitif.

Nos mesures d'activité et le dosage de manganèse n'ont porté que sur le suc carbonaté, et sur le liquide obtenu par dissolution du précipité, comme on vient de l'indiquer.

Voici les résultats obtenus ramenés à 100 cm³.

	C. D.	Extrait sec en g. p. 100	Cendres sulfatées en g. p. 100	Manganèse en mg. p. 100	Activité C. D. Extrait sec	Titre en Mn Mn en γ C. D.
Suc carbonaté.....	2800	13,35	4,122	2	209	071
Précipité formé par SO ₄ (NH ₄) ² ramené au volume primitif de la solution qui lui a donné naissance	1450	2,35(1)	< 0,0001	< 0,001	617	0,0007
(1) Renferme du sulfate d'ammonium.						

On constate en même temps qu'une purification totale, une perte d'activité de la laccase d'environ 50 p. 100.

Deux hypothèses peuvent expliquer cette perte d'activité :

1° L'action nocive du sulfate d'ammonium, 2° une précipitation incomplète de la laccase. Nous avons vérifié la première, en éliminant la totalité ou la majeure partie du sulfate d'ammonium par dialyse. Voici la technique utilisée :

Suc carbonaté 50 cm³
Solution saturée de sulfate d'ammonium..... 500 cm³

La précipitation est effectuée à la glacière pendant une journée.

Le précipité est ensuite recueilli sur un filtre sans pli, et dissous dans la plus petite quantité possible d'eau distillée. La solution obtenue est soumise à la dialyse pendant 3 jours. Dans le dialysat ramené à 100 cm³ et correspondant par conséquent à une dilution au demi du suc carbonaté, nous avons mesuré l'activité diastasique, ainsi que le taux en extrait sec et en cendres sulfatées, et nous avons dosé le manganèse.

Voici les résultats obtenus ramenés à 100 cm³.

	U. D.	Extrait sec en g. p. 100	Cendres sulfatées en g. p. 100	Mn en mg. p. 100
Suc carbonaté	3.300	13,650	4,150	3,05
Suc carbonaté précipité par le le sulfate d'ammonium puis dialysé	1.160	0,340	0,02	0,001

Nous constatons encore une perte importante dans l'activité : supérieure à 50 p. 100 par conséquent la présence du sulfate d'ammonium ne gêne pas l'activité de la laccase, et si dans cet essai avec dialyse, nous constatons une perte d'activité beaucoup plus grande que dans l'expérience précédente, on peut admettre que cette perte est due à une purification très poussée et que la laccase devient alors beaucoup plus altérable.

Expérience B.

La technique utilisée est la même que dans l'expérience A, mais le temps de précipitation à la glacière est de deux jours.

A cette expérience nous avons ajouté une étude de la précipitation en fonction du pH. Nous avons étudié simplement ce que devenait l'activité lorsqu'on précipitait à divers pH le suc carbonaté.

Voici les résultats :

Suc carbonaté en cm ³	Solution acide phosphatique à 12 p. 100 en cm ³	Solution saturée de sulfate d'ammonium en cm ³	pH.	C. D.
10	0	0	9,2	2.350
10	0	100	9	1.875
10	1	100	7,8	2.250
10	2	100	7,0	2.010
10	4	100	6,1	1.980

Cette expérience nous montre que, si l'on veut réduire la perte d'activité il est nécessaire d'amener le milieu à un pH convenable, qui est aux environs de 7.

Il est indispensable d'autre part, pour que la floculation du précipité s'effectue convenablement, d'opérer avec un suc préalablement traité au carbonate de sodium, et de prolonger la précipitation pendant deux jours à la température de 0° environ.

Voici un essai fait dans ces conditions avec les résultats des mesures d'activité et des dosages d'extrait sec, cendres sulfatées, fer et manganèse :

Suc carbonaté 50 cm³
Solution de sulfate d'ammonium..... 500 cm³

On amène séparément le suc carbonaté et la solution saturée de sulfate d'ammonium aux pH 7 et 6,1 par addition d'acide acétique.

La précipitation faite à la glacière dure 2 jours. Le précipité obtenu est recueilli sur un filtre sans plis et redissous dans 50 cm³ d'eau, c'est-à-dire ramené au volume initial du suc carbonaté. Voici les résultats obtenus.

	Concentration diastasique C. D.	Extrait sec en g. p. 100 cm ³	Cendres sulfatées en g. p. 100 cm ³	Manganèse en mg. p. 100 cm ³	Fer en mg. p. 100 cm ³	Titre en Mn $\frac{\text{Mn } \gamma}{\text{U D.}}$
Suc carbonaté	3.275	12,26	1,580	1,40	2,00	0,42
Suc carbonaté précipité par le sulfate d'ammonium à pH = 6,1	2.335	2,96	0,020	0,0020	Traces < 0,02	0,0085
Suc carbonaté précipité par le sulfate d'ammonium à pH = 7	2.250	3,70	0,020	0,20	Traces < 0,02	0,0078

On voit que la perte d'activité de la laccase est de l'ordre de 30 p. 100, mais que l'extrait sec (1), les cendres sulfatées, le fer et le manganèse, ont considérablement diminué. Nous éliminons par cette méthode une grande quantité de manganèse, en partant d'un suc carbonaté, qui ne renferme, déjà plus que 10 à 15 p. 100 du manganèse existant dans la préparation primitive.

CONCLUSIONS.

La précipitation par le sulfate d'ammonium est une méthode intéressante, pour la purification de la laccase.

Si elle aboutit à une perte relativement considérable de l'activité, elle permet par contre, une purification importante de cette diastase. D'autre part la grande solubilité du précipité permet d'obtenir des solutions concentrées de laccase dont la purification peut être encore poussée plus loin. Comme nous verrons par la suite, grâce à l'élimination du sulfate d'ammonium, par ultrafiltration.

(1) L'extrait sec est certainement très inférieur aux chiffres trouvés, car notre produit contient fatalement des quantités importantes de sulfate d'ammonium.

CHAPITRE II.

Dialyse.

Connue depuis 1861, grâce aux travaux de Th. GRAHAM, la dialyse est encore aujourd'hui une des méthodes les plus simples de purification des colloïdes, elle a été appliquée aussi bien aux colloïdes artificiels, qu'aux colloïdes biologiques : protéines du sérum, toxines, préparations diastasiques. Elle consiste à séparer par osmose spontanée, à travers une membrane, les substances colloïdales non dialysables, des substances diffusibles qui les accompagnent.

Après avoir été quelque peu délaissée, cette méthode si simple en apparence, est maintenant fréquemment utilisée lors de la purification des diastases particulièrement pour séparer l'apo-ferment du co-ferment.

A. Inconvénients de la dialyse.

Le premier inconvénient de la dialyse est d'ordre technique. Tout comme pour l'ultrafiltration, la préparation de la membrane dialysante de qualité constante, présente quelques difficultés sérieuses. La diversité des techniques proposées en est une preuve.

Les différences des membranes utilisées quant à leur nature, leur structure, la grandeur des pores, sont peut

être la cause des nombreuses discordances entre les résultats publiés sur un même sujet.

BECHHOLD [11] a donné il est vrai, le moyen de vérifier la grandeur des pores d'une membrane dialysante, en effectuant la dialyse avec des colloïdes dont les micelles, ont des dimensions variables. Mais il résulte des expériences de ce même auteur et de celles de THOMAS et Mlle KELLY [101] que la réaction du milieu modifie soit la grandeur des micelles, soit les pores des membranes.

Le deuxième inconvénient de la dialyse est qu'elle ne réussit jamais, si longue soit elle, à séparer complètement les colloïdes des impuretés qui les accompagnent. On remédie aujourd'hui à cet inconvénient en faisant de l'électrodialyse ou ionophorèse, mais dans ce cas il faut au préalable, soumettre les colloïdes à une purification suffisante.

Le troisième inconvénient de la dialyse, est sa longue durée. Si pour la purification de nombreux colloïdes le temps n'entre pas en ligne de compte ; pour les diastases, corps très labiles, la durée de la dialyse a son importance.

Un autre inconvénient de la dialyse, est la dilution importante qui en résulte pour les substances diffusibles et les colloïdes non dialysés. Lorsqu'on tente d'établir des bilans, cet inconvénient est très important, surtout pour les substances dialysables qu'il est impossible de doser à cause de leur grande dilution. On remédie à ces inconvénients, en utilisant certains appareils qui concentrent automatiquement le liquide dialysé (KOPACZEWSKI, RUSSENBERGER). Pour concentrer les colloïdes, on peut aussi utiliser la technique de PIETTRE et VILA [88] en faisant des dialyses successives contre l'eau distillée et du sirop de saccharose $D = 1,38$ ou de la glycérine $D = 1,27$.

Ce rappel des inconvénients que présente la dialyse, permet de comprendre le labeur important qu'exige cette méthode si l'on veut aboutir à de bons résultats et l'on conçoit pourquoi cette méthode si simple en apparence est parfois négligée.

B. Purification des diastases par dialyse.

Malgré ces nombreux inconvénients, la dialyse a été utilisée par un certain nombre d'auteurs, pour la purification des diastases les plus diverses, et elle a fourni parfois, des résultats importants.

A) Elle a permis d'établir d'une façon indiscutable l'existence des co-ferments. Etudiant la lipase MAGNUS [75] en 1904, a soumis à la dialyse l'extrait de foie, le pouvoir lipolytique du foie diminue progressivement au fur et à mesure que se poursuit la dialyse et finit par disparaître. La préparation reprend son activité par addition d'un extrait de foie inactivé par la chaleur (présence d'une co-enzyme thermolabile).

Grâce à la dialyse, HARDEN et YOUNG [53] en 1906, montrèrent la présence de la co-zymase dans le suc de levure.

B) Le rôle de certains électrolytes dans l'action des diastases a pu également être étudié. Par cette méthode BIERRY, GIAJA et V. HENRI [23] en dialysant le suc pancréatique, inactivèrent l'amylase et la maltase de ce suc, l'activité était rétablie ensuite par addition de certains électrolytes. L'amylase du foie inactivée par dialyse, a permis à STARKENSTEIN [96] de montrer le rôle du chlorure de sodium dans sa réactivation.

C) Dans la purification proprement dite des diastases, la dialyse joue aussi un rôle important. KOPACZEWSKI [66] en 1912 étudia la maltase et constata que la dialyse fait augmenter tout d'abord le pouvoir hydrolysant de cette diastase qui passe par un maximum, puis diminue légèrement. Une prolongation de l'opération, n'amène plus alors aucune modification appréciable de l'activité.

WILLSTÄTTER et RACKE [116] d'une part, EULER, d'autre part dans l'étude de la saccharase, font subir à des autolysats de levures des précipitations successives al-

cooliques, des adsorptions par les alumines, des élu-
tions et terminent par des dialyses avec des membranes de
collodion. Ils arrivent à l'aide de ces différentes métho-
des de purification, à une saccharase dont ils ont fait
l'analyse élémentaire.

C. Purification de la laccase par dialyse.

Nous avons appliqué la dialyse à la purification de la
laccase.

Des raisons d'ordre technique et matériel ne nous ont
pas permis, à notre grand regret, de faire des électro-
dialyses.

La durée de l'opération ne semble pas avoir une gran-
de influence sur l'activité de nos préparations diastasi-
ques, ainsi que le prouvent diverses expériences. La lé-
gère perte d'activité peut être due au passage de la dias-
tase à travers la membrane.

TECHNIQUE UTILISÉE. — Nos essais de dialyse n'ont
porté que sur les sucs ayant subi la précipitation par le
carbonate de sodium. Notre principal but, dans cette
opération, est d'éliminer les électrolytes, et tout spécia-
lement le carbonate de sodium en excès.

La dialyse, complètera donc la purification de la lac-
case par ce réactif.

A) *Préparation du suc pour la dialyse.* — Précipitation
par le carbonate de sodium (voir plus haut). Le Nuoc'
Son est traité par un égal volume de solution normale
de carbonate de sodium ; après centrifugation, le liqui-
de carbonaté actif est soumis à la dialyse.

B) *Appareil de dialyse.* — Nous avons utilisé le plus
simple, le dialyseur de GRAHAM (diamètre 15 cm.) et com-
me membrane dialysante des feuilles de cellophane du
commerce (épaisseur 0 mg.,2 environ).

C) Résultat.

Suc carbonaté soumis à la dialyse	120 cm ³
Suc dialysé recueilli	210 cm ³
Durée de l'opération	2 jours
Eau de dialyse remplacée 7 fois.	

Remarque. — Les chiffres des 5 premières colonnes du tableau sont rapportés selon les cas soit à 120 cm³ de suc avant dialyse, soit à la totalité du suc après dialyse (210 cm³).

Pour la définition de l'unité diastasique U. D. voir pages 65 et 66.

TABLEAU I.

	Unités diastasiques C. D.	Extrait sec en g.	Cendres sulf. en g.	Manganèse en mg.	Fer en mg.	Activité diastasique A. D.	Titre en Mn γ Mn/U. D.
Suc dilué au demi : 120 cm ³	3060	12,048	1,152	14,64	2,4	252	4,86
Suc carbonaté : 120 cm ³	3020	15,568	4,128	0,48	1,44	193	0,16
Suc dialysé : 120 cm ³	2436	6,825	0,609	0,21	0,63	357	0,08

Notre suc dialysé renfermait encore du carbonate de sodium ; les premières portions de ce sel s'éliminent très vite, ainsi qu'il est facile de le constater dès le début de la dialyse mais les dernières traces s'éliminent plus difficilement.

Dans l'expérience précédente, le pH du suc carbonaté qui était d'environ 9,2 devient après dialyse voisin de 7. Nous avons réalisé une nouvelle expérience en changeant le pH vers la fin de l'opération. Après une dialyse simple d'une durée de deux jours le suc carbonaté dialysé est amené au pH 4,8 par addition d'une quantité déterminée de solution tampon, l'opération est terminée comme précédemment.

Voici le schéma de cet essai :

Nuoc'Son dilué } volumes
Solution normale de carbonate de sodium.... } égaux

Après centrifugation 70 cm³ de suc carbonaté, sont soumis à une dialyse simple (Expérience A). 70 cm³ de ce même suc carbonaté sont soumis d'abord à une dialyse simple, d'une durée de deux jours, puis amenés au pH 4,8 (Expérience B). La durée totale de la dialyse dans ces deux essais a été de trois jours ; l'eau a été remplacée sept à huit fois.

Les résultats sont consignés dans le tableau ci-dessous et rapportés selon les cas soit à 70 cm³ de suc avant dialyse, soit à la totalité du suc après dialyse 240 cm³ pour le suc A ; 245 cm³ pour le suc B.

TABLEAU II.

	Unités diastasiques C. D.	Extrait sec en g.	Cendres sulf. en g.	Manganèse en mg.	Fer en mg.	Activité diastasiq. A. D.	Titre en Mn $\frac{\gamma \text{ Mn}}{\text{U. D.}}$
Suc dilué au demi: 70 cm ³	2065	7,560	0,714	11,90	0,98	273	5,76
Suc carbonaté : 70 cm ³	1995	9,086	2,674	4,2	0,28	219	2,10
Suc A dialysé : 240 cm ³	1860	2,976	0,288	0,24	—	626	0,13
Suc B dialysé à pH 4,8 : 245 cm ³	1797	2,866	0,220	0,19	—	628	0,10

CONCLUSIONS.

Si l'on prend comme terme de comparaison le suc avant l'action du carbonate de sodium, la double opération précipitation par le carbonate de sodium et dialyse, peut se faire avec une perte qui ne dépasse pas 20 p. 100 de l'activité diastasiq. initiale.

Dans les trois expériences, l'extrait sec est diminué de plus de moitié, de sorte que l'activité diastasique A. D. est presque doublée, les cendres subissent une diminution analogue, le fer est éliminé dans la proportion de 75 p. 100 et le manganèse par unité diastasique s'abaisse de 4,86 à 0,08 (Tableau I) et de 5,76 à 0,13 ou 0,10 (Tableau II).

Comme nous le verrons plus loin, en combinant la dialyse avec la défécation par le carbonate de sodium, on peut obtenir des sucres assez purifiés pour se prêter à des adsorptions simples et faciles.

CHAPITRE III.

Ultrafiltration.

Quoique la paternité du terme ultrafiltration revienne à BECHHOLD, cette méthode de purification des colloïdes, est restée longtemps cantonnée au domaine de la bactériologie. Elle était utilisée pour la stérilisation de l'eau ou des liquides qui ne pouvaient supporter l'action de la chaleur. En 1877, PASTEUR et JOUBERT, avaient recours au plâtre pour la stérilisation de leurs milieux. A. GAUTIER employait des bouteilles en porcelaine, et, en 1884, CHAMBERLAND, faisait connaître ses bougies en biscuit, qui reçurent de nombreuses applications. Plusieurs modifications ont été ensuite apportées à ces appareils ultrafiltrants (GAROS, BERKERFELD). MARTIN, en 1896, filtrait ses solutions colloïdales en les faisant passer sous une forte pression dans des bougies Chamberland, préalablement imprégnées de gélatine ou de silice.

Cependant l'ultrafiltration n'était pas susceptible d'application étendues, parce qu'elle restait encore d'une technique compliquée. Lorsque en 1904, MALFITANO, montra la possibilité d'utiliser le collodion pour la préparation des membranes ultrafiltrantes, l'ultrafiltration devint alors une méthode précieuse pour l'étude des colloïdes et applicable dans les divers domaines de la biologie.

De nombreux auteurs parmi lesquels BECHHOLD, ZSIGMONDY, THIESSEN, contribuèrent à son étude, et construisirent des appareils ultrafiltrants aussi nombreux que variés.

A. Principe et but de l'ultrafiltration.

Basée sur un principe différent de la dialyse, l'ultrafiltration permet d'atteindre le même but, c'est-à-dire, la purification des colloïdes par élimination des substances ultrafiltrables qui les accompagnent. Elle consiste à faire passer une solution colloïdale à travers une membrane imperméable aux colloïdes. L'utilisation du collodion, rend relativement facile la préparation de ces membranes, qui peuvent être plus ou moins perméables et permettent de séparer les micelles colloïdales du milieu disperser.

L'ultrafiltration présente sur la dialyse l'avantage d'être plus rapide, elle permet la concentration de la substance colloïdale à ultrafiltrer. L'étude du liquide intermicellaire devient beaucoup plus simple et plus facile, ce qui est d'une grande importance, lorsqu'on veut faire des études quantitatives. Cependant, tout comme la membrane dialysante, la membrane ultrafiltrante doit être homogène et toujours identique à elle-même, ces conditions difficilement réalisables constituent un grave inconvénient de la méthode.

Le mécanisme de l'ultrafiltration est encore peu connu, on a recours pour expliquer ce phénomène à plusieurs théories, dont les deux plus importantes sont : la théorie de la dissolution, et la théorie capillaire, que l'on trouvera exposés dans le traité de biocolloïdologie de KOPACZEWSKI. Même si l'on admet l'analogie étroite entre les membranes et un faisceau de tubes capillaires, il faut penser que l'ultrafiltration est la résultante de plusieurs phénomènes : actions électro-capillaires, orientation moléculaire (LANGMUIR) actions de surface, adsorption, etc...

B. Applications de l'ultrafiltration. Purification des diastases.

Grâce au collodion les applications de l'ultrafiltration se sont étendues dans de nombreux domaines. En bactériologie, elle permet la stérilisation des liquides, l'étude des virus filtrants. Dans l'industrie, elle permet la purification des colles, des gelées. En chimie biologique, elle a ouvert un champ nouveau à l'étude des colloïdes.

Cependant en ce qui concerne la purification des diastases, cette méthode ne semble pas avoir intéressé tous les auteurs. Sans prétendre citer tous les travaux sur les diastases où l'ultrafiltration a été utilisée ; rappelons que HOLDERER [59] en 1911 a étudié les conditions qui peuvent influencer l'ultrafiltration des diastases, sur la bougie Chamberland F. La réaction du milieu semble la plus importante. HOLDERER a soumis à l'ultrafiltration la sucrase de l'*Aspergillus niger*, l'émulsine, la maltase, etc... Par l'ultrafiltration, Gabriel BERTRAND et HOLDERER ont montré l'existence dans la macération d'*Aspergillus niger*, d'une nouvelle diastase : la cellulase.

C. Appareils utilisés.

Poursuivant notre essai de purification de la laccase, nous avons cru utile de soumettre à l'ultrafiltration nos préparations diastasiques.

De nombreux appareils ultrafiltrants ont été préconisés, dûs à MALFITANO, BECHHOLD, ZSIGMOND, etc.. La membrane ultrafiltrante utilisée généralement en collodion, est en forme de doigt de gant, ou elle est simplement constituée par une membrane plane, quelquefois on imprègne de collodion des supports ultrafiltrants de BECHHOLD et HOENIG, ils sont en porcelaine spéciale durcie et la partie filtrante n'est pas émaillée. On peut donner à ces supports des formes variables. Nous avons uti-

lisé des bougies Chamberland L2, dont les dimensions sont : 1 cm. de diamètre, 5 cm. de hauteur.

La membrane ultrafiltrante est obtenue en plongeant ces bougies dans du collodion (voir plus loin).

Nous avons utilisé un appareil ultrafiltrant présentant beaucoup d'analogie avec celui qu'utilisait MARTIN en 1896, pour la filtration de ses solutions colloïdales ; un tel système a servi à GIEMSA [49], puis avec quelques perfectionnements à HIRTH et TCHIEMBER [58] et à DELAVILLE [31]. Nous avons simplement remplacé, dans l'appareil ultrafiltrant de DELAVILLE, le petit manchon de papier de SCHLEICHER, par une bougie de Chamberland L2 qui sert de support à la couche de collodion.

La bougie est traversée par un tube capillaire, et par l'intermédiaire d'une fiole de KITASATO, reliée à un appareil à vide. COURTOIS [30].

Nous avons connu trop tard l'appareil de GRABAR [50] pour l'utiliser dans nos recherches. Cependant les inconvénients que présente notre système ultrafiltrant par rapport à l'ultrafiltre de GRABAR, peuvent être réduits au minimum si on observe les deux précautions suivantes :

1° Rendre l'appareil étanche.

2° Prendre la précaution de placer dans la fiole de KITASATO, où se rassemble l'ultrafiltrat, quelques centimètres cubes d'eau pour réaliser une atmosphère saturée de vapeur d'eau et empêcher ainsi la concentration de l'ultrafiltrat par évaporation.

a) PRÉPARATION DU COLLODION.

La constitution des membranes de collodion, a été l'objet de nombreuses recherches, dans le but d'obtenir des membranes à pores de dimensions variables, permettant de retenir les colloïdes de différentes dimensions. On a utilisé soit du collodion acétique, soit du collodion éthéro-alcoolique, en faisant varier la con-

centration et les proportions d'alcool et d'éther. SIGAUD [93] insiste sur la préparation de la nitro-cellulose, il conseille d'utiliser des collodions dont la teneur en nitro-cellulose varie de 1,5 à 6 p. 100 et de s'en tenir de préférence au taux de 2,5 p. 100.

Le facteur considéré comme le plus important dans la préparation de la membrane ultrafiltrante est la composition du mélange d'alcool et d'éther utilisé. Les dimensions des pores des membranes semblent diminuer lorsque les proportions relatives d'alcool s'élèvent.

La résistance, la perméabilité de la membrane, paraissent aussi dépendre de ces proportions pour lesquelles SIGAUD a indiqué les limites suivantes :

70 parties d'alcool à 96°	}	donnent une membrane perméable.
30 parties d'éther		
30 parties d'alcool à 96°	}	donnent une membrane perméable.
70 parties d'éther		

On conseille aussi, sans preuve expérimentales bien nettes, de laisser vieillir le collodion, et surtout les membranes obtenues, pendant un certain temps à l'étuve à 37° ce qui améliorerait la perméabilité.

La pression semble jouer aussi son rôle dans l'ultrafiltration, certains auteurs conseillent des pressions allant de 10 mm. de Hg à une atmosphère, d'autres conseillent de ne pas dépasser 300 mm. de Hg.

Depuis l'époque où ces recherches ont été exécutées, GRABAR a indiqué une technique extrêmement minutieuse permettant l'obtention de membranes de porosité bien déterminée.

b) TECHNIQUE UTILISÉE.

Dans nos essais d'ultrafiltration, nous avons utilisé le collodion éthéro-alcoolique, après une étude sur la teneur en cellulose et les proportions d'alcool à utiliser, nous avons adopté la technique suivante :

Nitrocellulose Poulenc	1 g.,5
Ether pur	30 cm ³
Alcool à 96°	70 cm ³

La nitrocellulose effilochée est d'abord imprégnée d'éther, l'alcool est ajouté ensuite par petites portions. Après une agitation lente, le collodion obtenu est conservé dans un flacon bien bouché, qui est maintenu renversé sous une couche d'eau.

Préparation de la bougie ultrafiltrante. — La bougie Chamberland L2 longuement lavée à l'eau, à l'alcool et à l'éther, par aspiration, est séchée à l'étuve à 100° pendant deux heures au moins. Si la bougie a déjà servi à une ultrafiltration, on opère de même après raclage de la membrane de collodion.

Dans une éprouvette de 30 cm³, on verse lentement le collodion ci-dessus, en évitant les bulles d'air puis on plonge lentement la bougie Chamberland, de façon que le niveau du collodion dépasse la partie poreuse, et sans attendre, on retire lentement la bougie en prenant soin de bien égoutter la dernière goutte de collodion qui se forme à la partie inférieure ; on imprime un mouvement de rotation à la bougie, son grand axe étant maintenu horizontal, peu à peu l'éther et l'alcool s'évaporent, et on obtient ainsi une première couche. La durée de cette opération est de l'ordre de deux à trois minutes. On la recommence deux fois. Après évaporation de l'alcool-éther, l'appareil est prêt à fonctionner. Quelques précautions doivent être prises :

1° Lors de l'évaporation de l'éther et de l'alcool, ne pas souffler sur la bougie pour hâter l'évaporation.

2° Eviter les bulles d'air lors de l'immersion de la bougie dans le collodion.

3° Le collodion qui a servi à l'immersion ne doit plus être utilisé car une partie des solvants volatils s'est évaporée et la concentration du collodion a varié.

c) VÉRIFICATION DU SYSTÈME ULTRAFILTRANT.

Nous avons vérifié nos ultrafiltres au début de nos essais, et quelquefois après utilisation. Pour contrôler la

perméabilité des ultrafiltres, BÉCCHOLD [10] a proposé plusieurs méthodes, et a donné une table qui permet de déterminer exactement la perméabilité du filtre utilisé. Parmi les méthodes qu'il indique, la plus simple consiste à filtrer un hydrosol d'hémoglobine (dimension de la micelle environ 2 μ). Si le liquide passe incolore, l'ultrafiltre retient la plupart des sels minéraux.

Nous avons opéré de façon analogue avec une solution d'hémoglobine, obtenue de la manière suivante : quelques centimètres cubes de sang dilués dans du sérum physiologique sont centrifugés ; après deux lavages consécutifs avec du sérum physiologique, par centrifugation, le culot d'hématies est mis en suspension dans autant de fois 100 centimètres cubes d'eau distillée, qu'on a utilisé de centimètres cubes de sang. Après hémolyse ce liquide est soumis à l'ultrafiltration.

Nous avons essayé, aussi nos ultrafiltres avec du sérum sanguin dilué dans cent parties de sérum physiologique.

La plupart d'entre eux n'ont laissé passer ni la solution d'hémoglobine, ni le sérum dilué au 1/100^e soit avant, soit après ultrafiltration de la laccase.

D. Ultrafiltration de la laccase.

A l'aide du système ultrafiltrant indiqué ci-dessus, nous avons soumis à l'ultrafiltration les sucres de laque de Nuoc'Son plus ou moins dilués.

20 cm³ de ce liquide sont soumis à l'ultrafiltration qui fournit 10 cm³ d'ultrafiltrat. Si la laccase est un colloïde, et que notre membrane ultrafiltrante retienne les particules les plus petites de ce colloïde, la partie non ultrafiltrée doit avoir une activité double de l'activité primitive puisque dans l'opération la concentration se trouve doublée.

TABLEAU III.

Ultrafiltration au pH = 9,2 $\left\{ \begin{array}{l} \text{suc dilué au } 1/3 \dots\dots\dots 40 \text{ cm}^3 \\ \text{solution N. Co}_3\text{Na}_2 \dots\dots\dots 40 \text{ cm}^3 \end{array} \right\}$ centrifuger.
on opère avec 20 cm³ du liquide surnageant.

	Unités diastasiques U. D.	Extrait sec en g.	Cendres sulfatées en mg.	Manganèse en mg.	Activité C. D. extrait sec	Titre en Mn Mn en γ U. D.
	1	2	3	4	5	6
Suc non traité par Co ₃ Na ₂ mais dilué au 1/6 : 20 cm ³	141,5	1,725	15,5	3,2	82,2	22,7
Suc traité par Co ₃ Na ₂ : 20 cm ³	137,5	2,240	74,5	0,435		3,18
Ultrafiltration totale..						
1° non ultrafiltrable.....	145	1,44	18	0,27	100	1,86
2° ultrafiltrat	0	0,960	525	0,125		
Ultrafiltration totale et lavage.						
1° non ultrafiltrable.....	130	0,990	10,5	0,15	131	0,86
2° ultrafiltrat.....	3,3	1,315	5	0,10		
3° liquide du lavage.....	0	0,230	10,5	0,05		

Remarque : Les valeurs données dans les colonnes 1, 2, 3 et 4 se rapportent à la totalité des produits mis en œuvre.

Remarque : On voit que, le mélange du suc primitif et de l'ultrafiltrat nous conduit toujours à une perte d'unités diastasiques qui est de l'ordre de 10 p. 100. Nous constatons ici sous une autre forme ce que nous avons déjà observé dans nos précipitations alcooliques ou acétoniques.

Conclusions. — De ces trois expériences, il résulte que notre système ultrafiltrant, préparé et vérifié selon la technique donnée précédemment est susceptible d'arrêter complètement la laccase, ainsi que le prouve l'inactivité de nos ultrafiltrants et le maintien quasi intégral de l'activité dans le suc non ultrafiltrable. La perte en unités diastasiques U.D. est d'environ 12 p. 100 dans les cas les plus défavorables.

E. Ultrafiltration de la laccase en fonction du pH.

On a vu dans les chapitres précédents que si la précipitation de nos suc par le carbonate de sodium permet d'éliminer par simple précipitation, en plus des matières étrangères qui accompagnent la laccase, une grande partie du manganèse (environ 95 p. 100) une certaine quantité de celui-ci résiste à la précipitation.

Nous avons pensé que le pH du suc soumis à l'ultrafiltration, pourrait avoir une influence sur le passage du manganèse dans le filtrat.

HOLDERER [59], dont nous avons déjà signalé les travaux, a étudié en 1911, le rôle de la réaction du milieu sur la filtration des diastases sur la bougie Chamberland F.

Cet auteur a soumis à l'ultrafiltration toute une série de diastases, parmi lesquelles l'émulsine, la sucrase, une peroxydiatase (au pH 7 et à la neutralité au méthylorange) les diastases sont presque complètement retenues. Entre ces deux réactions, la filtrabilité est intermédiaire.

A. W. THOMAS et Mlle M. KELLEY [101] ont montré que l'ultrafiltration des hydrosols de tanins présente un maximum au pH 3,0 et un arrêt sensible au pH 7,0.

Il semble donc qu'un colloïde, en l'espèce une diastase, peut être retenu ou non par un ultrafiltre suivant la réaction du milieu.

Essai d'ultrafiltration en fonction du pH.

Nos essais peuvent être répartis en trois groupes caractérisés par une réaction du milieu différente (pH 5, 2-9, 2-4,6). Pour les expériences au pH 5,2, nous avons utilisé le suc brut, simplement dilué sans aucune purification préalable, lui laissant ainsi sa réaction naturelle ; dans les deux autres cas, nous avons employé des suc préalablement déféqués au carbonate de sodium.

TABEAU IV.

Ultrafiltration au pH = 4,6.

Suc dilué au 1/5 40 cm³ } centrifuger. Recueillir le liquide
Solution N de Co₃Na₂ 40 cm³ } surnageant.

On amène ce liquide à pH = 4,6 à l'acide d'une solution
étendue d'acide phosphorique.

	Unités diastasiques U. D.	Extrait sec en g.	Cendres sulfatées en mg.	Manganèse en mg.	Activité U. D. extrait sec	Titre en Mn Mn en γ U. D.
	1	2	3	4	5	6
Suc non traité par Co ₃ Na ₂ mais dilué au 1/10 : 20 cm ³	99	0,920	85	1,75	107	17,6
Suc traité par Co ³ Na ₂ : 20 cm ³	92,5	1,375	615	0,44		2,6
Suc traité par Co ₃ N ₂ et acidifié....	94	1,895	805	0,45		2,7
Ultrafiltration totale						
1° non ultrafiltrable	83	0,575	115	0,15	144	1,8
1° ultrafiltrat.....	0	1,28	640	0,30		
Ultrafiltration totale et lavage.						
1° non ultrafiltrable	83	0,490	6	0,05	169	0,6
2° ultrafiltrat.....	0	1,260	655	0,32		
3° liquide de lavage.....	0	0,200	100	0,10		
Remarque : Les valeurs données dans les colonnes 1, 2, 3 et 4 se rapportent à la totalité des produits mis en œuvre.						

Pour chaque groupe nous avons effectué :

- une ultrafiltration simple,
- une ultrafiltration avec lavage.

Le volume de liquide mis en œuvre est de 20 cm³ dans chaque expérience.

Nos résultats sont groupés dans les trois tableaux ci-joints (II — III — IV).

Il est essentiel de remarquer que les résultats consignés dans les tableaux (colonnes 1, 2, 3, 4) sont rapportés à la totalité du liquide mis en œuvre. Ils représentent des valeurs absolues que, pour la comparaison, il faut

rapporter au volume de solution traité avant de subir l'ultrafiltration.

Les résultats de ces expériences que nous commenterons plus loin, en particulier, ceux du tableau IV, (pH 4,6) nous ont amené à penser que l'ultrafiltration en milieu acide, suivie de nombreux lavages, serait susceptible d'améliorer nos préparations.

Ce sont deux expériences destinées à vérifier ces suppositions que nous résumons ci-dessous.

EXPÉRIENCE A. — Opérant toujours avec la même technique (traitement par le carbonate de sodium, et ultrafiltration au pH 4,8) nous avons utilisé un volume beaucoup plus grand de suc. Pour réaliser l'ultrafiltration, nous avons employé 5 ultrafiltres et les opérations (ultrafiltration et lavage) ont duré une semaine.

Nous sommes partis d'un suc qui renfermait 4.725 unités diastasiques, dans un volume de 75 cm³. Après traitement par le carbonate de sodium ce suc ramené au pH 4,8 contenait 4,500 unités diastasiques dans un volume de 150 cm³. Après ultrafiltration et lavage, le résidu, redissous dans 50 cm³ d'eau distillée a donné un liquide contenant 2.750 unités diastasiques.

Voici les résultats trouvés quant à la concentration diastasique, l'activité, l'extrait sec, les cendres, le manganèse et le fer pour 100 cm³.

TABLEAU V.

	Concentration diastasique C. D.	Extrait sec en g. p. 100 cm ³	Activité C. D. extrait sec	Cendres sulfatées en g. p. 100 cm ³	Manganèse en mg. p. 100 cm ³	Titre en Mn Mn en γ U. D.	Fe en mg. p. 100
Suc non purifié.....	3,150	11,80	267	0,763	47,2	14,9	12,1
Suc carbonaté ramené au pH = 4,8	3,000	14,78	202	5,28	6,7	2,13	3,4
Suc non ultrafiltrable concentré.....	5,500	2,83	1.964	0,143	0,48	0,087	<10,01

EXPÉRIENCE B. — 100 cm³ (Nuoc'Son) sont traités par un égal volume de solution normale de carbonate de sodium. Après centrifugation, 150 cm³ de suc ainsi dilué au demi sont ramenés au pH 4,7 dilué par addition de quantités convenables d'acide phosphorique au 1/10^e et ultrafiltrés. La durée de l'ultrafiltration a été d'une semaine, au cours de laquelle on a procédé sur l'ultrafiltre à de nombreux lavages à l'eau distillée.

150 cm³ de Nuoc'Son, dilués au demi, renfermaient 4.425 unités diastasiques, 150 cm³ de suc carbonaté renfermaient 4.275 unités diastasiques.

Après ultrafiltration et lavage, la partie non ultrafiltrée (provenant de 150 cm³ de la dilution au demi carbonatée de suc primitif et ramenée au volume de 50 cm³) renferme 3.550 unités diastasiques. On retrouve donc 80 p. 100 de l'activité primitive. Voici les résultats expérimentaux quant à la teneur en extrait sec, cendres sulfatées, manganèse et fer.

TABLEAU VI.

	U. D.	Résultats pour 5 cm ³			
		Extrait sec en g.	Cendres sulfatées en g.	Manganèse en mg.	Fer en mg.
Suc brut dilué au 1/2....	p. 0 cm ³ , 2.... 5,9	0,544	0,055	0,85	0,05
Suc carbonaté.....	p. 0 cm ³ , 2.... 5,7	0,649	0,191	0,04	0,01
Non ultrafiltrable.....	p. 0 cm ³ , 4.... 7,5	0,189	0,012	0,009	< 0,01

Et voici les résultats pour 100 :

TABLEAU VII.

	Concentration diastasique C. D.	Extrait sec en g. p. 100	Activité C. D. extrait sec	Cendres sulfatées p. 100	Manganèse en mg p. 100	Titre en Mn Mn en γ U. D.	Fer en mg. p. 100
Suc au départ dilué au 1/2	2,950	10,88	270	2,750	17,0	5,75	1,0
Suc carbonaté	2,850	12,98	249	3,82	0,80	0,28	0,20
Non ultrafiltrable.....	7 500	3,78	1.973	0,240	0,18	0,024	traces

Pour la signification des abréviations voir pages : 69 et 70.

CONCLUSIONS.

1° Nos ultrafiltres retiennent pratiquement la totalité de l'activité oxydasique de nos préparations, sans que la réaction du milieu dans les limites où nous sommes placés, paraisse influencer cette propriété.

2° L'ultrafiltration permet dans tous les cas d'éliminer une partie des matières solubles. Nous voyons ainsi l'activité s'élever surtout lorsque nous pratiquons un lavage après ultrafiltration complète. C'est ainsi que dans le tableau II (pH 5,) l'activité passe de 72,8 à 200.

3° Les matières minérales, cendres sulfatées subissent également une diminution marquée, elles s'abaissent de 150 mg. (tableau I) (teneur du suc brut pour 80 cm³) à 35 mg. dans le résidu lavé de l'ultrafiltration. Les expériences sur les sucres déféqués au carbonate de sodium donnent une teneur encore plus faible en éléments minéraux, surtout si l'ultrafiltration est faite en milieu acide.

4° La teneur en manganèse est également fortement abaissée puisque toujours dans le tableau I elle tombe de 3 mg.,25 à 0 mg.,85, mais ces variations sont encore plus intéressantes à suivre dans le cas où le suc soumis à l'ultrafiltration a été au préalable déféqué par le carbonate de sodium, ce qui a pour résultat comme nous

l'avons montré précédemment d'éliminer près de 90 p. 100 du manganèse, sans toucher à l'activité. C'est le cas des tableaux II et III.

Les expériences résumées dans le tableau III (exécutées au pH 9,2) montrent qu'une bonne partie du manganèse qui a échappé à l'entraînement du carbonate de sodium est sous la forme ultrafiltrable, puisque nos 20 cm³ de suc déféqué au carbonate de sodium qui, avant ultrafiltration, contenait encore 0 mg.,43 de manganèse n'en contiennent plus que 0 mg.,15 après ultrafiltration et lavage, sans que l'activité ait sensiblement varié.

L'ultrafiltration en milieu acide (pH 4,6 tableau IV) permet d'abaisser encore très nettement cette limite, puisque la teneur en manganèse, qui était primitivement de 1 mg.,75 avant l'action du carbonate de sodium, tombe à 0 mg.,24 après l'action de ce réactif, et elle n'est plus que de 0 mg.,05 après ultrafiltration et lavage. Le titre en manganèse (γ de Mn par UD) s'abaisse ainsi de 17 γ ,6 à 0 γ ,6.

Enfin si au lieu d'une seule reprise par l'eau, on poursuit longuement le lavage on arrive à éliminer en même temps que de nouvelles quantités d'impuretés (ce qui augmente sensiblement l'activité) des quantités appréciables de manganèse de sorte que, le titre en manganèse (Mn exprimé en γ , par unité diastasique) s'abaisse de 14,9 à 0,087 pour l'expérience A (Tableau IV) et de 5,75 à 0,24 pour l'expérience B (tableau VI). Dans ce dernier cas, le titre en Mn de la diastase purifiée par ultrafiltration n'est plus que les 4/1.000^e environ du titre du suc brut.

Toutefois il semble que le lavage n'arrive pas à enlever les dernières traces de manganèse qui seraient ainsi sous forme colloïdale.

5° Du point de vue pratique, on voit que l'ultrafiltration à partir des sucs déféqués au carbonate de sodium permet de purifier très largement nos préparations en les débarrassant de leurs éléments minéraux,

CHAPITRE IV.

Adsorption et élution.

L'adsorption mise en œuvre méthodiquement par WILSTÄTTER et son école, a permis d'obtenir des diastases à un degré de pureté et de concentration, jusque là jamais atteint.

Les techniques de l'adsorption sont beaucoup plus simples, beaucoup moins brutales que celles utilisant des réactifs chimiques.

L'adsorption exige, cependant des préparations diastatiques suffisamment purifiées, et à ce titre, elle fait suite et elle complète les autres méthodes de purification (précipitation, dialyse, ultrafiltration).

Ces dernières méthodes employées au début de la purification, ne provoquent pas de trop grandes pertes de l'activité, grâce semble-t-il, aux colloïdes qui protègent la diastase ; mais lorsque la purification est très avancée et que la diastase devient de plus en plus sensible, seule l'adsorption est utilisable, et elle permet grâce à son inocuité, de pousser très loin la purification.

L'adsorption permet au chercheur de réaliser une élimination progressive des diverses substances que l'on rencontre constamment dans les préparations diastatiques et de reconnaître par là même, si telle ou telle substance est nécessaire, indifférente ou nuisible à l'activité de la diastase.

Les travaux de WILLSTÄTTER et de ses collaborateurs nous montrent la valeur de cette méthode. C'est ainsi que WILLSTÄTTER, SCHNEIDER et WENSEL [117] ont ob-

tenu la saccharase de la levure de bière, à un degré de pureté élevé. Ils ont pu notamment séparer cette diastase de la « gomme de levure » en effectuant des adsorptions successives avec un hydrate d'alumine et avec le kaolin. Leurs préparations les mieux purifiées ne donnaient plus les réactions des protéines, (Réaction de Milon négative) et ne renfermaient plus que des traces de tryptophane (Réaction Xanthoprotéique légèrement positive). Les réactions des glucides avaient aussi disparu. De même pour la peroxydase du raifort, WILLSTÄTTER et POLLINGER [115] ont réussi, grâce aux méthodes de purification par adsorption, à obtenir une préparation diastasique très concentrée, ne renfermant plus ni protides, ni glucides, et dans laquelle le fer et le phosphore étaient éliminés en grande partie. WILLSTÄTTER et ses élèves ont réussi également à faire disparaître les réactions des protéines et des glucides dans les lipases et les estérases du pancréas, du foie, dans l'amylase pancréatique.

C'est encore par l'adsorption, que WILLSTÄTTER [110] étudiant une peroxydase végétale, et que KRAUT et BAUER [68] examinant la papaïne montrèrent la présence de corps inhibiteurs, séparables par adsorption.

Les applications de l'adsorption à l'étude des diastases du tube digestif montrèrent à WALDSCHMIDT LEITZ [107] le rôle d'activateur que joue l'entérokinase sur la trypsine pancréatique. La trypsine avec l'entérokinase attaque les protéines, la trypsine débarrassée d'entérokinase par adsorption n'attaque plus que les peptones.

A. Historique de l'adsorption des diastases.

L'histoire de l'adsorption des diastases peut être divisée en trois étapes.

1° La première étape correspond aux recherches d'auteurs isolés. Leurs essais quoique ingénieux, sont restés à l'arrière plan dans la littérature des diastases parce

qu'ils ne comportaient pas de mesures quantitatives. Il manquait d'autre part aux chercheurs de cette époque les données si précieuses qu'apportèrent plus tard la chimie physique, et la chimie biologique.

La première expérience sur l'adsorption semble être due à Ernest BRUCKE [27] qui en 1861, dans une étude sur la digestion constate la fixation de la pepsine sur une substance solide, extrêmement divisée, telle que le phosphate de chaux, le soufre ou le cholestérol. Pour libérer la diastase de l'adsorbat, BRUCKE utilisa l'acide phosphorique pour dissoudre le phosphate de chaux, ou l'éther pour dissoudre le cholestérol. Mais le manque de méthodes, d'étude quantitative de la pepsine, ne permit pas à cet auteur d'utiliser avantageusement cette technique de purification.

L'année suivante, dans le laboratoire de KUHN, DANILEWSKY publia un travail qui, s'il avait été étudié à fond aurait pu être riche en conséquences. En partant d'un suc pancréatique sans pouvoir lipasique, et utilisant le collodion comme adsorbant, DANILEWSKY réalisa l'adsorption de la diastase protéolytique (trypsine) et utilisant l'albumine comme adsorbant il réalisa l'adsorption de l'amylase avec des traces de trypsine, il put même éluer la trypsine par l'alcool dilué.

Les essais d'adsorption furent continués au laboratoire de KUHN en 1863 par J. COHNHEIN [29]. Celui-ci traitant par adsorption la salive avec du phosphate de calcium, obtint après lavage à l'eau, une ptyaline active dépourvue de mucine. En traitant de la même façon une macération pancréatique, il obtint une solution d'amylase sans trypsine.

En 1872, O. HAMMARSTEN [52] décrivit une méthode avec laquelle il pu obtenir une chymosine de pepsine, par précipitation avec le carbonate de magnésium ou avec une solution d'acétate de plomb.

Par une autre méthode de purification, J. P. PAWLOW et S. W. PARATSCHEN et O. HAMMARSTEN montrèrent plus

tard que la solution de chymosine, renferme de la pep-sine inactive.

2° La deuxième étape de l'histoire de l'adsorption des diastases comprend les recherches de toute une série d'auteurs, qui donnèrent des bases nouvelles à l'adsorption, et préparèrent en quelque sorte les travaux de WILLSTÄTTER et de ses collaborateurs.

C'est ainsi que HÉRISSEY [56] dans son travail sur l'émulsine étudia l'action du tanin sur cette diastase. Une préparation d'émulsine donne avec le tannin un précipité abondant. Alors que le filtrat est inactif sur l'amygdaline, le précipité complexe émulsine-tanin double ce glucoside très rapidement. Malheureusement l'auteur n'a pu éluer ensuite l'émulsine du précipité obtenu. De ce travail il faut toutefois retenir un fait important l'action de certains réactifs sur les diastases est susceptible de déterminer un précipité actif par suite de l'entraînement par adsorption. Il n'est pas nécessaire comme l'a montré HÉRISSEY et comme le démontrèrent plus tard BOURQUELOT et BRIDEL [26] pour assurer l'action des diastases de les utiliser à l'état de dissolution. Cette action du tannin mise en évidence par H. HÉRISSEY a été utilisée avec profit par WILLSTÄTTER et POLLINGER [115] et WILLSTÄTTER et STOLL [118] sur une peroxydase végétale déjà extrêmement purifiée.

Des essais d'adsorption qui furent très nets au point de vue des résultats sont contenus dans les travaux de HEDIN [54] en 1907.

Cet auteur réussit par adsorption fractionnée, une séparation très intéressante de trois protéases de la rate, protéases agissant partie en solution acide, et partie en solution alcaline, et contenant par conséquent un mélange de peptases et de tryptases. Il utilisa la terre d'infusoire (Kieselguhr) qui adsorbe la tryptase, tandis que l'enzyme agissant en milieu acide reste en solution (peptase).

HEDIN constata d'autre part que la tryptase était toujours adsorbée par le charbon quelle que soit la réaction du milieu. Il réussit l'élution avec une solution de caséine à température relativement élevée.

MICHAELIS et EHRENREICH [82] d'une part et ICOVESCO [62] d'autre part, apportèrent dans l'étude de l'adsorption des diastases des précisions d'ordre physico-chimique.

MICHAELIS et EHRENREICH [80 et 81] étudièrent les propriétés électro-chimiques des diastases et des adsorbants. Ils admirent que l'adsorption dépendait de la charge électrique de la diastase et de celle de l'adsorbant. Ainsi le kaolin chargé négativement adsorbe les bases et l'alumine chargée positivement adsorbe les acides ; l'invertine adsorbée par l'alumine ne l'est jamais par le kaolin ; cette diastase présenterait donc un caractère acide. La ptyaline de la salive, la trypsine adsorbées indifféramment par le kaolin et par l'alumine, sont des corps amphotères.

ISCOVESCO étudia l'action du courant électrique sur les colloïdes et constata que l'albumine coagulée prend une charge positive dans l'eau acidulée et une charge négative dans l'eau distillée. Si l'on fait passer le courant à travers un suc gastrique renfermant de l'albumine coagulée, on constate à l'anode une activation de la digestion pepsique. Grâce à l'action du courant électrique, la pepsine a donc été adsorbée par l'albumine dont la charge est positive.

L. AMBARD [1] en 1920, en étudiant le mécanisme de la digestion amylolytique, utilisa l'adsorption de l'amylase par l'amidon de riz cru. L'amylase se fixe sur l'amidon cru, et si, cet adsorbat après lavage à l'eau est mis en présence d'empois d'amidon, celui-ci est aussitôt hydrolysé.

J. EFFRONT [35] étudia l'adsorption de la ptyaline par la cellulose des filtres. La ptyaline, se fixe plus fortement à chaud qu'à froid, et n'est pas éluable par l'eau, ni par

les solutions sucrées. Elle entre en solution en présence d'empois d'amidon ou de chlorure de sodium.

3° La troisième étape de l'histoire de l'adsorption des diastases est la plus importante. D'une part le rôle de la réaction du milieu (ph) permet de réaliser des adsorptions et des éluions dans des conditions bien déterminées. D'autre part, les mesures quantitatives de l'activité des diastases se perfectionnèrent.

Les résultats ne se firent pas attendre, ils furent si nets, si concluants, qu'à l'heure actuelle, les méthodes d'adsorption sont considérées par la plupart des auteurs, comme le principal moyen de purification des diastases.

Cette troisième étape est l'œuvre presque entière de WILLSTÄTTER et de ses collaborateurs. Il y a peu de diastases que WILLSTÄTTER n'aient tenté de soumettre à des essais d'adsorption. Non seulement il a réussi à porter à un degré très élevé la purification des diastases, à séparer de nombreuses diastases entre elles, mais il a de plus, donné des techniques précises, et défini les modalités de chaque adsorption. Cette étude systématique, a amené WILLSTÄTTER et KRAUT [114] à étudier les adsorbants eux mêmes et spécialement les hydrates d'alumine. Si la bibliographie de l'adsorption des diastases a été relativement simple dans les deux premières étapes, elle devient très compliquée dans cette troisième partie. Il est impossible de citer ici tous les travaux de WILLSTÄTTER et de ses collaborateurs, on consultera avec fruit les auteurs suivants : en langue allemande : Von EULER [37] OPPENHEIMER et KUHN [86] d'OPPENHEIMER-PINCUSSEN [87] et en langue française, les conférences de : E. LE BRETON [71] de FABRE [43] AUBEL et GENEVOIS [2] et une revue de G. VALETTE [105].

A côté de l'œuvre immense de WILLSTÄTTER, de nombreux auteurs apportèrent une importante contribution à l'étude de l'adsorption des diastases. Là encore, il nous est impossible d'énumérer les publications de chacun d'eux, on se rapportera aux ouvrages d'ensemble cités ci-dessus.

Cependant nous devons mentionner les travaux de MADINAVEITTIA [74] qui appliqua un des premiers (1912) dans le laboratoire de WILLSTÄTTER, l'adsorption pour la purification de la catalase. Cet auteur utilisa des acides gras comme adsorbants. Plus tard HENNICHs [57], continuant les travaux de BATTELI et STERN [8], utilisa l'adsorption par l'alumine pour la purification de la catalase. La solution de catalase purifiée d'abord par des précipitations fractionnées à l'aide d'alcool, est acidifiée par l'acide acétique et traitée par une suspension d'alumine qui fixe 90 p. 100 de catalase. L'adsorbat séparé par centrifugation est élué par une solution de phosphate disodique. L'éluat est ensuite soumis à la dialyse dans un sac de collodion.

HENNICHs utilisa aussi pour l'adsorption de la catalase le kaolin qui, d'après lui, fixe moins facilement cette diastase que ne le fait l'alumine, mais donne de meilleurs résultats au point de vue de la pureté. Par cette méthode HENNICHs est arrivé à obtenir une préparation 300 à 400 fois plus active que la première, et il en a fait l'analyse que nous croyons inutile de reproduire ici.

A côté de l'école de WILLSTÄTTER, EULER et ses collaborateurs contribuèrent pour leur part, à l'étude des phénomènes d'adsorption des diastases, en ce qui concerne la cinétique, soit la purification des diastases.

C'est ainsi que EULER et JOSEPHSON [40] modifiant encore les techniques de HENNICHs pour l'étude de la catalase remplacent, pour l'éluion, les phosphates alcalins, par l'ammoniaque et pratiquent la dialyse à basse température ils purent obtenir ainsi une catalase 700 fois plus active que la préparation initiale.

EULER et MYRBÄCH [42] ont réalisé des adsorptions de l'invertine en utilisant l'hydrate d'alumine comme adsorbant et l'ammoniaque comme agent d'éluion. Ils ont étudié l'adsorption en fonction du pH, et trouvé que leur préparation d'invertine est fixée par l'alumine dans une proportion voisine de 90 p. 100 entre les pH 5 et 7.

SHERMAN (H.C) CALDERWELL (M. L) et ADAMS (M.) [92] purifièrent par adsorption l'amylase d'une pancréatine commerciale extraite par une solution de glycérol à 87 p. 100. L'adsorption est réalisée par une suspension de gel d'alumine en présence d'alcool. A un pH compris entre 5,2 et 6 avec une teneur en alcool de 25 p. 100 et une suspension d'alumine dont la teneur en Al_2O_3 comprise entre 0 g.,60 et 0 g.,80 pour 100 cm^3 de diastase, ils adsorbent environ 90 à 95 p. 100 de l'amylase contenue dans leur préparation. Pour l'élution ils obtiennent d'excellents résultats en utilisant une solution diluée de soude 0,0015 M. à basse température. Le volume de solution alcaline employée est le tiers ou le quart du volume de la solution diastasique utilisée pour l'adsorption.

B. Théories de l'adsorption.

La complexité des phénomènes d'adsorption a engendré nécessairement une multitude d'hypothèses, tendant à expliquer leur mécanisme.

Les phénomènes d'adsorption s'observent au contact de deux phases différentes — phases solide et phase gazeuse — ou phase solide et phase liquide — et traduisent tous l'enrichissement de la phase solide au dépend de la phase gazeuse ou liquide — En ce qui concerne l'adsorption des diastases, c'est la phase solide qui s'enrichit aux dépens de la phase liquide. Cet enrichissement est plus ou moins accentué selon les conditions, et les circonstances peuvent rendre également la réversibilité du phénomène plus ou moins facile.

Quand une substance dissoute est captée par un corps rigide (adsorbant) un grand nombre de phénomènes peuvent entrer en jeu, capillarité moléculaire (processus de MICHAELIS), condensation, réactions chimiques, de sorte qu'il est très difficile de distinguer l'adsorption et l'absorption.

C'est pourquoi J. W. Mac BAIN, [7] Von EULER, [57] KOPACZEWSKI [64] rangent tous ces phénomènes sous le terme général de sorption. Sur les caractères généraux de l'adsorption dont l'étude sortirait du cadre de ce travail, on consultera avec fruit les ouvrages de Von EULER [37] KOPACZEWSKI [64] et la revue de FABRE [44]. Nous n'envisageons ici que la partie de l'adsorption qui a trait aux diastases.

D'après WILLSTÄTTER et ses élèves, reprenant une théorie esquissée par G. BERTRAND, une diastase est une substance chimique active fixée sur un support colloïdal. Pour une diastase donnée la nature de ce support colloïdal peut varier, c'est-à-dire que le groupement chimique actif qui constitue la diastase proprement dite peut passer d'un support sur un autre, suivant les conditions du milieu sans que l'activité diastasique varie. C'est ce qu'on effectue lorsqu'on réalise des adsorptions, la diastase passe de son support colloïdal naturel sur le support colloïdal qui est l'adsorbant lui-même.

MICHAELIS et EHRENREICH [82] admettent que l'adsorption dépend de la charge électrique de la diastase et de celle de l'adsorbant. L'alumine est alcaline et chargée positivement, le kaolin est acide et chargé négativement, et les diastases qui se fixent sur l'un ne peuvent en général se fixer sur l'autre. Toutefois l'on doit tenir compte de l'état de pureté de la préparation diastasique, et WILLSTÄTTER discute les conclusions de MICHAELIS et de EHRENREICH qui ne tiennent pas compte du rôle des corps accompagnant la diastase dans l'adsorption. Ainsi sous l'action du courant, l'invertine en solution impure se porte à l'anode et elle est adsorbée par l'alumine (tonerde) ; après purification, elle va aux deux pôles et elle est adsorbée par le kaolin (WILLSTÄTTER, GRASER et KUHN [112]. La saccharase incomplètement purifiée est adsorbée par l'alumine, purifiée d'avantage elle devient amphotère (WILLSTÄTTER et RAKE [116]). L'amylase provenant des extraits du pancréas est

adsorbable par l'alumine, mais il est facile de la rendre non adsorbable par les adsorbants acides ou basiques en la purifiant WILLSTÄTTER et WALDSCHMIDT-LEITZ [119]. Il semble d'après toutes les expériences de WILLSTÄTTER qu'il est difficile de fixer a priori, la charge et la modalité d'adsorption de telle ou telle diastase, et comme le fait si bien remarquer Mlle Eliane LE BRETON, une diastase de signe positif peut être engagée dans un complexe colloïdal avec un excès d'un colloïde négatif et son affinité pour tel ou tel adsorbant peut être de ce fait totalement modifiée. Il semble donc que l'hypothèse de MICHAELIS d'après laquelle les adsorbants agissent par leur propriété basique ou acide sur les complexes diastatiques de charge électriquement opposée n'est pas suffisante pour expliquer tous les faits expérimentaux. Pour H. KRAUT, le rôle des charges électriques des adsorbants et de la diastase est indiscutable mais sur cette action s'en greffe d'autres, de nature chimique, qui obligent à chercher les conditions appropriées à chaque purification par adsorption. WILLSTÄTTER a encore perfectionné les techniques d'adsorption, en utilisant des adsorbants sélectifs, les travaux sur ce sujet semblent fournir un nouvel argument contre les idées de MICHAELIS.

WILLSTÄTTER et KRAUT [114] ont préparé et étudié toute une série d'hydrates d'alumine qui possèdent des propriétés sélectives vis à vis de telle ou telle diastase. Ils ont trouvé que les corps chimiquement voisins, présentent de grande différences quant à l'adsorption. Le gel d'alumine Al_2O_3 rapidement vieilli est supérieur à un gel d'alumine très frais, en ce qui concerne l'adsorption élective d'un mélange de saccharase et de maltase.

WILLSTÄTTER et BAMANN [111] ont trouvé que pour séparer la maltase et la saccharase, il faut se servir de « tonerde » bien définie. On peut ajouter d'autres exemples de ce genre, notamment dans la séparation des enzymes provenant de l'appareil digestif.

L'orthohydroxyde d'aluminium rapidement vieilli absorbe beaucoup de trypsine, lentement vieilli il n'adsorbe

plus de trypsine (WALDSCHMIDT-LEITZ, SCHÄFFNER, W. GRASSMAN [108]. Ces deux sortes d'hydroxyde d'aluminium adsorbent l'érepsine, et pour séparer la trypsine de l'érepsine il faut se servir de l'orthohydroxyde lentement vieilli. Le métahydroxyde adsorbe contrairement à l'hydroxyde, plus de trypsine que d'érepsine.

Citons encore les expériences devenues classiques de la séparation des trois diastases pancréatiques à l'aide du kaolin et de l'alumine par WILLSTÄTTER. On trouvera d'autre part de nombreux exemples d'adsorption sélective dans l'intéressante conférence d'Eliane LE BRETON [71].

C. Théorie de l'élution.

L'élution est le phénomène inverse de l'adsorption c'est la décomposition d'une combinaison d'adsorption. En traitant l'adsorbant chargé de diastase par une solution minérale de pH défini, différent de celui où s'est effectué l'adsorption on fait passer l'enzyme en solution tandis qu'une partie des impuretés qui accompagnaient la diastase restent fixées sur l'adsorbant. Parfois le déplacement de la diastase est obtenu avec des substances pour laquelle la diastase a une grande affinité.

Nous avons vu que AMBARD [1] déplaçait l'amylase fixée sur l'amidon cru par l'empois d'amidon ; J. EFFRONT [35] déplaçait la ptyaline fixée sur ses filtres de cellulose par l'empois d'amidon ; HEDIN [54] élue la tryptase par la caséine.

MEYERHOF [79] a utilisé le sucre de canne pour libérer la saccharase de sa liaison avec l'hydroxyde de fer. D'après les travaux de WILLSTÄTTER d'une part et de MICHAELIS [80] d'autre part, il semble que l'élution du sucre de canne n'est pas spécifique, et qu'il n'y a pas seulement élution de l'enzyme, mais aussi de son substratum.

Tout comme l'adsorption, l'élution a demandé des recherches particulières. Il semble qu'il soit nécessaire que

l'adsorbat renferme à côté de l'enzyme certaines substances favorisant l'élution. WILLSTÄTTER et RACKE [116] ont été les premiers à faire des expériences sur ce point. Leurs travaux portèrent sur l'élution de l'invertine dans les adsorbats de tonerde. Si l'adsorption est effectuée dans les autolysats obtenus rapidement en traitant la levure par le toluène, l'invertine est éluable par l'ammoniaque diluée, mais si on neutralise l'activité produite pendant l'autolyse, les adsorbats de tonerde ne peuvent plus être élués par l'ammoniaque. Si au contraire on soumet à l'adsorption des autolysats préalablement déféqués par l'acétate de plomb, c'est le contraire que l'on observe : l'adsorbat est élué par l'ammoniaque diluée.

Dans tous les adsorbats, on peut éluer l'invertine par du phosphate d'ammonium. WILLSTÄTTER et RACKE, expliquent ces faits en admettant que les diastases ne sont pas toujours fixées directement sur l'adsorbant, mais qu'elles sont fixées par des composés intermédiaires, qu'il ont appelés « co-adsorbants ». Ainsi la liaison directe enzyme-adsorbant pourrait être éluee par l'ammoniaque, tandis que la liaison enzyme-co-adsorbant-adsorbant ne présenterait pas ce caractère. D'autre part les enzymes pourraient aussi former d'autres combinaisons avec des substances qui les accompagnent et auxquels s'attaquent les produits utilisés pour l'élution. Ces substances sont appelées co-éluants. Les deux sortes de substances co-adsorbantes et co-éluantes peuvent prendre part à l'adsorption avec l'enzyme.

En schématisant la composition des complexes diastatiques à base de saccharase, WILLSTÄTTER et RACKE, ont envisagé les 3 cas suivants :

1° Enzyme $\begin{cases} \text{co-adsorbant-adsorbant} \\ \text{co-éluant} \end{cases}$

ce complexe est éluable par l'ammoniaque diluée.

2° Enzyme — co adsorbant — adsorbant
complexe non éluable par l'ammoniaque.

3° Enzyme — adsorbant
complexe non éluable par l'ammoniaque.

Dans l'autolysat de levure non neutralisé on aurait à faire au complexe [1] où malgré le co-adsorbant l'enzyme peut être élué par l'ammoniaque.

Cette théorie a fait ses preuves, plus tard dans plusieurs exemples l'existence des co-adsorbants a été prouvée. C'est ainsi que l'amylase pancréatique d'après WILSTÄTTER, WALDSCHMIDT-LEITZ et HESSE [120] perd complètement sa faculté d'être adsorbée par l'alumine si on lui enlève certains corps qui l'accompagnent normalement (co-adsorbant).

Reste à expliquer le rôle des phosphates dans l'élu-tion il semble que le mode d'action des phosphates soit différent de celui de l'ammoniaque diluée, ceci indépendamment de la variation de pH qu'ils produisent.

EULER et ERIKSON [39] ont constaté que l'hydroxyde d'aluminium adsorbe de grandes quantités de phosphates. On peut penser que l'élu-tion par le phosphate est due au remplacement de l'enzyme par le phosphate plus facilement adsorbable (adsorption d'échange).

D. Les facteurs de l'adsorption.

Malgré les nombreux travaux publiés, l'adsorption de la diastase n'est pas sans difficultés. Cette méthode de purification exige au préalable, toute une série d'essais qui rebutent souvent les chercheurs trop pressés. Il faut, en effet, pour chaque diastase, édifier une technique opératoire qui dépend de facteurs aussi nombreux que variés.

a) INFLUENCE DE LA PURETÉ DES DIASTASES.

Généralement, il faut faire subir des purifications plus ou moins poussées aux préparations diastasiques avant de les soumettre à l'adsorption. Et, à ce titre, les méthodes d'adsorption dépendent de toutes les autres méthodes de purification, qu'elles sont destinées à compléter. On utilise

généralement des précipitations, alcooliques et acétoniques, mais celles-ci sont parfois insuffisantes, tel est le cas du suc d'arbre à laque qui renferme une quantité considérable de substances étrangères. Il existe une méthode originale et intéressante pour l'obtention d'une bonne préparation diastasique, méthode qui, malheureusement ne s'applique qu'à des cas restreints, mais qui permet d'avoir une diastase à un excellent degré de pureté. C'est celle que WILLSTÄTTER et STOLL [118] ont utilisé pour la préparation de la peroxydase du raifort. Ces auteurs réalisent une adsorption de la peroxydase. La racine fraîche du raifort, bien mondé et lavée, est découpée perpendiculairement à son axe longitudinal en tranches de un demi millimètre d'épaisseur, après un lavage à l'eau courante pendant plusieurs jours, les racines sont traitées par l'acide oxalique (solution à 2 p. 100) qui fixe la peroxydase dans les cellules. Le produit est égoutté et broyé jusqu'à l'obtention d'une pulpe qui est filtrée au Buchner sur filtre en tissu, le produit est encore lavé avec la solution d'acide oxalique à 2 p. 100. Puis le résidu exprimé est traité par une suspension de baryte, qui élue la peroxydase. Par filtration on obtient une solution de peroxydase qui, en solution alcoolique à 50 p. 100 est directement adsorbable par l'alumine.

La composition chimique de la préparation diastasique joue aussi un rôle important. De fortes teneurs en albumine, en glucides, la présence de substance résineuses ou gommo résineuses s'opposent à l'adsorption.

C'est ainsi que WILLSTÄTTER et RACKE [116] pour pouvoir réaliser des adsorptions de l'invertine de la levure de bière ont dû abandonner l'autolyse sans antiseptique de C. O. SULLIVAN et F. V. TOMPSON [98] (car ces solutions renferment trop d'albumines et d'hydrates de carbone) pour utiliser la méthode plus rationnelle de C. S. HUDSON et N. S. PAINE [60] : l'hydrolyse partielle avec addition de toluène ; mais là encore il est nécessaire pour réussir d'adsorption, de laisser vieillir ces solutions d'in-

vertine pendant plusieurs mois, pour permettre la digestion complète des substances albumineuses. WILLSTÄTER et SCHNEIDER [117] acidifient fortement l'invertine obtenue d'après la méthode d'HUDSON. Elle est alors adsorbable par le kaolin.

KRAUT et RUBENBAUER [69] purifient l'estérase du foie (extrait de foie ammoniacal) par dialyse avant de faire l'adsorption.

b) INFLUENCE DE LA RÉACTION DU MILIEU.

Lorsque la préparation diastasique est suffisamment purifiée pour être soumise à l'adsorption, il faut faire une étude de celle-ci en fonction de la réaction du milieu, car il existe un pH optimum d'adsorption, comme il existe un pH optimum d'activité diastasique. Les divers pH sont obtenus en utilisant des solutions tampons de faible concentrations pour ne pas surcharger en électrolytes la préparation diastasique purifiée. Nous avons constaté en effet au cours de nos essais d'adsorption, que des préparations de laccase renfermant beaucoup de carbonate de sodium ne peuvent pas être adsorbées à moins de recourir à certains artifices que nous indiquerons plus loin.

EULER et MYRBACK [42] ont fait des expériences sur l'influence de l'acidité sur l'adsorption de la saccharase par l'hydrate de tonerde. Ils utilisèrent comme mélange tampon le mélange acide acétique et ammoniaque et trouvèrent que le pH optimum d'adsorption est voisin de 6 pour leur préparation de saccharase. Environ 90 p. 100 de la saccharase sont adsorbés à ce pH.

EULER et JOSEPHSON [41] ont pensé découvrir une relation entre l'optimum du pH d'adsorption et les propriétés amphotères de la saccharase.

La présence des impuretés rend parfois délicates les variations du pH, c'est ainsi que NORTHOP [85] travaillant sur la trypsine, dont la purification était moins

poussée que celle de la saccharase, a trouvé un maximum d'adsorption sur charbon très étendu compris entre pH 3 et pH 9, c'est-à-dire quasi indépendant de la réaction du milieu.

Lord NORDFELT a trouvé que l'oxynitrilase de l'émulsine est adsorbée par l'alumine, aussi bien en milieu alcalin qu'en milieu acide.

La réaction du milieu si importante pour l'adsorption de la diastase joue encore un grand rôle dans la séparation des diastases entre elles, tel est le cas des diastases pancréatiques : lipase, amylase et trypsine (WILLSTÄTTER et WALDSCHMIDT-LEITZ [119]).

c) INFLUENCE DE LA DILUTION.

L'adsorption se manifeste surtout lorsque les préparations diastasiques sont diluées. Des adsorptions difficiles à réaliser dans certains cas deviennent possibles lorsqu'on dilue au 1/100 ou au 1/1.000 les préparations diastasiques, mais on rencontre alors des difficultés matérielles qui, limitent l'emploi de cet artifice.

C'est ainsi que WILLSTÄTTER et KRAUT [114] ont constaté que le rendement de certaines adsorptions est influencé par la concentration initiale du corps adsorbé :

Une quantité déterminée d'hydrate d'alumine est mise en adsorption avec 0,046 unités de saccharase dans 50 cm³ d'eau on obtient une adsorption de 50 p. 100. Si on porte la dilution à 100 cm³ l'adsorption est de 82 p. 100, si on la porte à 200 cm³ on obtient une adsorption de 95 p. 100. Les deux auteurs ont fait les mêmes observations pour l'invertine, pour la lipase du foie, la lipase de l'estomac, la peroxydase, la papaïne, mais ce phénomène ne s'observe pas pour tous les enzymes, ni à tous les degrés de pureté.

WILLSTÄTTER et WASSERMAN [121] ont étudié l'adsorption de l'invertine en solution diluée. En partant d'un autolysat vieilli de levure, purifié par adsorption sur kaolin. Ils ont obtenu après adsorption par l'alumine et

élution à l'aide du phosphate d'ammonium une préparation diastasique dont la valeur en saccharase était de 0,036 unités ; mais en partant d'un autolysat dix fois plus dilué, ils ont obtenu par la même technique une préparation d'invertine 30 fois plus active et correspondant à une valeur en saccharase, égale à 1.

d) INFLUENCE DE CERTAINES SUBSTANCES.

A côté de la réaction du milieu et de la dilution, certaines substances ajoutées à la préparation diastasique préalablement purifiée favorisent l'adsorption.

Ainsi la présence de l'alcool ou de l'acétone dans les préparations de peroxydase, rendent cette diastase plus facilement adsorbable. L'amylase qui est indifférente aux adsorbants électropositifs et électronégatifs devient adsorbable par la terre à foulon lorsqu'elle est additionnée d'alcool ou d'acétone.

La glycérine facilite l'adsorption de la lipase, mais elle la diminue pour l'amylase. Il semble que l'addition d'alcool, de glycérine, d'acétone, développe le caractère soit acide soit basique des substances amphotères qui accompagnent les diastases, comme l'ont constaté WILSTÄTTER et WALDSCHMIDT-LEIZT [120] dans le cas des acides aminés et des polypeptides.

E. Marche à suivre pour réaliser une adsorption.

Connaissant les divers facteurs qui influencent l'adsorption, on peut résumer dans leur grandes lignes les techniques opératoires qui permettent de la réaliser.

1° Obtention d'une préparation diastasique adsorbable

a) purification des préparations diastasiques

b) si besoin est, utilisation de véritables adjuvants favorisant l'adsorption (alcool-glycérine).

2° Détermination du pH, optimum d'adsorption, par l'étude de l'adsorption à divers pH, sur des parties aliquotes de la préparation diastasique.

3° L'adsorption s'effectue en mélangeant la suspension de l'adsorbant et la préparation diastasique, et en agitant mécaniquement. La durée de l'adsorption devra être déterminée au préalable.

4° La séparation de l'adsorbat s'effectuera à la centrifugeuse.

5° L'adsorbat étant obtenu, réaliser l'élution en faisant varier la réaction du milieu dans les plus grandes limites possibles, au moyen des solutions tampons.

Préparation des adsorbants.

Les adsorbants les plus utilisés sont des gels trouvés dans la nature ou préparés au laboratoire (hydroxydes de métaux). Leur pouvoir d'adsorption est généralement fonction du développement de leur surface, les substances qui ont le plus grand pouvoir d'adsorption sont surtout les combinaisons polyvalentes, c'est-à-dire celles qui ont le plus de tendances à former des composés multiples. Seuls les gels d'alumine, (hydrates de tonerde) ont fait l'objet d'études très poussées. WILLSTÄTTER et KRAUT [114] étudièrent leurs constitutions chimiques et montrèrent qu'il en existe différentes sortes.

Une propriété importante des gels d'alumine est leur vieillissement, qui joue un grand rôle dans leur pouvoir adsorbant. La grosseur des particules augmente avec le temps avec une vitesse variable d'un gel à un autre, et leur surface d'adsorption diminue parallèlement. Il y a souvent un changement dans la composition chimique, par perte d'eau inter et intramoléculaire, et formation d'anhydrides à partir d'hydroxydes. Le pouvoir sélectif de tel hydroxyde vis-à-vis de plusieurs diastases peut ainsi varier avec le temps.

Aussi étant donné ces diverses propriétés des adsor-

bats utilisés surtout sous forme de gel, il ne faut en aucune façon s'écarter de la technique opératoire exacte donnée par WILLSTÄTTER pour leur préparation.

Les lavages destinés à éliminer les électrolytes des gels sont très importants, et il faut les prolonger le plus possible, on reconnaît que les électrolytes sont complètement éliminés au fait que les gels se déposeront plus difficilement et qu'ils ont tendance à se peptiser. Quoique n'ayant pas utilisé tous les adsorbants décrits ci-après nous croyons faire œuvre utile en donnant leur mode de préparation.

I. Gels d'alumine. - WILLSTÄTTER et KRAUT [114] ont déterminé trois groupes de composés colloïdaux de gels d'alumine selon les combinaisons qui existent entre $\text{Al}(\text{OH})_3$ et H_2O . Selon le mode de préparation, ils aboutissent à des corps différents.

Ces auteurs préparèrent.

1° Alumine C obtenue par précipitation par l'ammoniaque étendue sans chauffage prolongé.

2° Alumine A obtenue par précipitation au moyen d'un excès d'ammoniaque concentrée, suivie d'un chauffage prolongé.

3° Alumine B. obtenue par précipitation au moyen d'un excès d'ammoniaque concentrée, non suivie d'un chauffage prolongé.

Ces diverses espèces d'alumine se distinguent entre elles par leur simple aspect physique. A et B sont plastiques, C est pulvérulente. L'alumine C correspond au moment de la précipitation, à l'orthohydroxyde C_α , qui instable se transforme assez vite à une forme β laquelle à son tour devient mais plus lentement une forme C_γ . Voici les diverses propriétés et le mode de préparation de ces orthohydroxydes (C_α , C_β , C_γ) et des alumines A et B. que nous avons trouvés dans la littérature Allemande (Oppenheimer-Pincussen-Die Methodik der Fermentation).

a) *Orthohydroxydes*. — Obtenus en précipitant le sulfate d'aluminium dans les conditions les plus douces, avec un très léger excès d'ammoniaque, et en ajoutant comme tampon du sulfate d'ammonium. On obtient un gel $\text{Al}(\text{OH})_3$ qui est l'hydroxyde $\text{C}\alpha$ très soluble dans les acides et les bases. Cette forme se transforme en quelques heures en une forme $\text{C}\beta$ moins soluble dans les acides et les bases, et qui se distingue par une adsorption plus sélective sur un mélange de maltase et de saccharase.

L'orthohydroxyde $\text{C}\beta$ se transforme peu à peu (en quelques semaines) en un hydroxyde C dont la formule est encore $\text{Al}(\text{OH})_3$.

Voici la différence qui existe entre ces trois formes d'orthohydroxydes, quant à leur solubilité dans l'acide chlorhydrique dilué, et la soude diluée.

L'orthohydroxyde $\text{C}\alpha$ se dissout à froid dans HCl à 0,1 p. 100 et se dissout dans Na OH à 0,4 p. 100 à froid.

L'orthohydroxyde $\text{C}\beta$ se dissout à froid seulement dans HCl à 10 p. 100 et se dissout dans Na OH à 0,4 p. 100 à froid.

L'orthohydroxyde $\text{C}\gamma$ se dissout à froid seulement dans HCl à 37 p. 100 et ne dissout pas dans Na OH à 4 p. 100 à froid.

PRÉPARATION DE L'ORTHOHYDROXYDE. — 100 cm^3 d'ammoniaque à 10 p. 100 sont versés dans 600 cm^3 d'eau à 63°, contenant 22 g. de sulfate d'ammonium ; on refroidit à 58° et on ajoute en une seule fois et en agitant fortement 150 cm^3 d'une solution renfermant 76 g.,7 d'alun ammoniacal et portée à 58° ; la température s'élève à 61°. On maintient 10 minutes en agitant à 58°. Le mélange est ensuite soumis à une centrifugation rapide. On lave 5 fois le précipité obtenu avec 1 litre et demi d'eau chaque fois, en se servant de la centrifugation pour séparer le précipité du liquide surnageant. A la première eau de lavage on ajoute 12,5 d'ammoniaque à 10°, à la 2^e le double, et ainsi de suite, à la 6^e centrifugation le liquide surnageant est trouble. Le précipité

ne renferme que des traces de sulfates. Toute l'opération dure 2 heures 1/4.

La transformation de $C\alpha$ en $C\beta$ commence quelques heures après la précipitation quelquefois au bout de 5 heures 1/2 la transformation est complète, dans certains cas elle est à peine commencée. L'aspect change, la suspension floconneuse devient une masse compacte de couleur tirant sur le jaune.

PRÉPARATION DE L'HYDROXYDE C. — Les lavages n'ont aucune influence dans la transformation de $C\beta$ en $C\gamma$, celui-ci ne s'obtient que quelques semaines après la préparation du $C\beta$.

WILLSTÄTTER et KRAUT, appellent cet hydroxyde $C\gamma$, le tonerde C. Voici comment ces auteurs le préparent.

Une solution chaude de 340 g. d'alun ammoniacal dans 500 cm³ d'eau est versée en une seule fois dans 3 l. 250 d'eau ammoniacale, renfermant du sulfate d'ammonium et portée à 60° (100 g. $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$, 215 cm³ ammoniacque à 20 p. 100, c'est-à-dire 39 g.,2 d'ammoniaque au lieu de 36 g.,3 trouvé par le calcul). On agite vivement pendant 15 minutes sans laisser descendre la température au dessous de 60° ; le précipité volumineux au début, devient ensuite floconneux. On dilue à 20 litres on lave par décantation, on ajoute 40 cm³ d'ammoniacque à 20 p. 100 à l'eau de lavage de la 4^e décantation pour décomposer le sulfate aluminium basique formé à partir du sulfate d'ammonium. On lave jusqu'à ce que le liquide ne reste plus clair. Décanter encore deux fois au moins pendant quelques jours. Au bout de quelques semaines, vérifier la transformation complète des orthohydroxydes. Avec l'ammoniacque à 10 p. 100 à chaud α et γ donnent en 48 heures une poudre grossièrement blanche, β ne change pas d'aspect.

b) *Polyhydroxydes.* — On les obtient en utilisant un excès d'ammoniacque, mais une solution ammoniacale trop forte ou trop faible, donne comme impureté de l'or-

thohydroxyde, qui se forme *lorsque l'alcalinité n'est pas maintenue entre certaines limites déterminées.*

La concentration, la plus favorable est l'ammoniaque à 15 p. 100 à la température de 58 à 60°, pendant 48 heures. On obtient des polyhydroxydes de 4 à 8 atomes de Al et à longueur de chaînes variables de $(4 \text{ Al (OH)}_3) - 3 \text{ H}_2\text{O}$ renfermant 27 p. 100 d'eau à $(8 \text{ Al (OH)}_3) - 7 \text{ H}_2\text{O}$ renfermant 2 p. 100 d'eau.

PRÉPARATION DE L'HYDROXYDE B. — 250 g. $(\text{SO}_4)_3 \text{ Al}_2$, 18 H_2O sont dissous dans 750 cm^3 d'eau à 55° ; cette solution est versée en une fois et agitant énergiquement dans 2 l. 500 d'ammoniaque à 5 p. 100 en poids portée à 55°. La température monte à 58°, et sera maintenue en agitant continuellement pendant une 1/2 heure. Le précipité volumineux devient moins épais pendant la digestion, mais il n'est pas floconneux. On dilue à 12 litres et on lave à maintes reprises par décantation.

POLYHYDROXYDE A. — La précipitation se fait comme pour l'hydroxyde B, à 55°, et en agitant pendant une demi-heure. Après séparation de l'eau mère, le précipité est placé dans un ballon de 5 litres, muni d'un réfrigérant à reflux, et maintenu à l'ébullition pendant 48 heures. Puis on lave par décantation, en introduisant un peu d'ammoniaque à la 4^e décantation. Le lavage est terminé lorsque le liquide reste trouble. Le gel est devenu plastique.

II. *Préparation du kaolin.* — Le kaolin renferme beaucoup d'impuretés, entre autres CaO et FeO ; 500 g. de kaolin sont mis avec 1 l. 500 de Hcl $d = 1,18$; on chauffe au réfrigérant à reflux, très lentement, de façon à atteindre l'ébullition à la fin de la journée. Puis une autre journée à ébullition vive. On dilue et on lave par décantation. On répète trois fois ce traitement à l'acide chlorhydrique et les lavages par décantation. La préparation demande 15 jours environ.

Valeur d'adsorption. (Adsorptionswert A. W.). — Le pouvoir adsorbant d'un gel pour une diastase, étant fonction de la quantité d'adsorbant utilisé. WILLSTÄTTER et RACKE [116] d'abord, et WILLSTÄTTER et WASSERMAN [121] ensuite, ont adopté une unité de mesure du pouvoir d'adsorption qu'ils désignent par l'abréviation A. W. (Adsorptionswert).

Le A. W. est le nombre d'unités diastasiques adsorbées par un gramme d'adsorbant (ramener pour l'alumine à $\text{Al}_2 \text{O}_3$).

Applications. Purification de la laccase par adsorption et élution.

Adsorption de la laccase.

Nous avons appliqué la méthode d'adsorption à la purification de la laccase. Il était, en effet, intéressant pour nous, en utilisant les indications longuement développées dans les pages précédentes, de faire des essais de purification de la laccase par adsorption et élution et de suivre en même temps, les variations du fer et du manganèse.

Pour résoudre le double problème de l'adsorption et de l'élution il était nécessaire de rechercher les diverses conditions à remplir permettant de réaliser, tout d'abord l'adsorption.

Nous avons entrepris, cette étude d'une façon systématique en étudiant l'adsorption en fonction du pH sur le suc d'arbre à laque brut, puis, des sucs de plus en plus purifiés.

Ce n'est que lorsque l'adsorption fut réalisée avec un excellent rendement que nous avons fait des essais d'élution en fonction du pH. Enfin lorsque cette dernière nous eut fourni des résultats satisfaisants, nous avons étudié les variations du fer et du manganèse, par rapport à l'activité de la laccase.

a) *Préparations de la laccase utilisées.* — Nous avons utilisé :

- 1° Suc brut plus ou moins dilué.
- 2° Suc préalablement précipité par l'acétone
- 3° Suc traité par le carbonate de sodium
- 4° Suc traité par le carbonate de sodium et dialysé.

C'est surtout ce dernier qui nous a permis de réaliser de bonnes adsorptions et de bonnes élutions.

b) *Choix des adsorbants.* — Le choix des adsorbants à utiliser s'est trouvé limité par la nécessité où nous nous trouvions de suivre le sort du fer et du manganèse. C'est ainsi qu'il nous a été impossible d'utiliser le kaolin, la terre à foulon (tonsil) la tellite (terre d'infusoires) car ces produits renferment du fer et du manganèse en quantités trop grandes, pour permettre cette étude.

Le traitement à l'acide chlorhydrique, comme le conseille WILLSTÄTTER pour éliminer, le fer, le manganèse, le calcium que renferment les trois produits, s'est montré insuffisant.

Il aurait été nécessaire de recourir à un procédé beaucoup plus long et beaucoup plus compliqué, consistant après traitement par l'acide chlorhydrique et lavage à l'eau, en une électroosmose prolongée comme l'a réalisée WILLSTÄTTER.

Néanmoins dans les premiers essais d'adsorption nous avons utilisé, dans un but purement comparatif la cellite et le tonsil mais toute notre étude a surtout porté sur l'adsorption avec les aluminés A. B. et C. de WILLSTÄTTER.

Le mode de préparation de ces aluminés a été donné dans les pages précédentes. Du fait que nous étudions, les variations du fer et du manganèse dans la purification de la laccase, nous avons pris la précaution de purifier, par trois cristallisations successives, les sels d'aluminium servant à la préparation des aluminés A.B. et C.

Les lavages par décantation de ces aluminés, une dizaine environ, fournissent un hydrate d'alumine qui se dépose mal et semble vouloir se peptiser, la dispersion est alors maximum. Cette alumine est recueillie sur un Buchner, et mise ensuite en suspension dans la plus petite quantité d'eau. Les dernières eaux de lavages ne donnent plus les réactions des sulfates et de l'ammoniacque.

c) *Technique utilisée.* — Le suc brut dilué, ou plus ou moins purifié est amené à un pH, déterminé à l'aide

d'une solution de carbonate de sodium ou d'acide acétique, puis agité mécaniquement pendant un quart d'heure avec le culot de centrifugation d'une suspension d'adsorbant conventionnellement choisi.

Par centrifugation, on sépare l'adsorbat et on mesure l'activité diastasique avant et après l'action de l'adsorbant, mesure, qui permet de fixer le pourcentage d'adsorption.

Remarque. — Des essais nombreux nous ont montré en effet qu'il y avait bien adsorption. La mesure de l'activité diastasique du liquide surnageant après l'adsorption et la mesure de l'activité du complexe d'adsorption laccase-alumine (comme l'a effectuée HÉRISSEY pour le complexe d'adsorption émulsine-tannin) nous ont permis de constater que toute l'activité passe dans l'adsorbat. L'élution, par la suite, nous fournira encore une autre preuve.

I. — Adsorption du suc de laque brut.

Cette étude ne nous a pas donné de bons résultats.

L'action de l'alumine A, de la cellite et du tonsil, sur le suc d'arbre à laque (Nuoc Son) tel qu'il se présente nous a permis de réaliser une adsorption de laccase, mais les résultats ont été peu satisfaisants, le taux d'adsorption de la laccase a été variable, selon le pH et selon l'adsorbant utilisé, mais généralement peu élevé.

Nous jugeons inutile de donner ici tous les résultats trouvés dans cette étude, nous nous contenterons de donner les meilleurs d'entre eux. C'est au cours de ces expériences en faisant subir à nos préparations de laccase des variations de pH au moyen du carbonate de sodium, que nous avons trouvé l'action si intéressante de ce sel, action longuement exposée dans un chapitre précédent.

Résultats. — Voici les meilleurs chiffres obtenus aux pH les plus favorables.

Alumine A — adsorption de 20 p. 100 au pH.....	4,2
Alumine B — adsorption de 14 p. 100 au pH.....	5,2
Tonsil — adsorption de 15 p. 100 au pH	8,9
Cellite — adsorption de 21 p. 100 au pH.....	8,9

Avec le suc dilué au 1/5 les résultats ont été beaucoup plus faibles.

II. — Adsorption du suc de laque préalablement précipité par l'acétone.

Cet essai n'a pas donné de meilleurs résultats que le précédent. Le suc est précipité par deux fois son volume d'acétone. Le précipité est ramené après sa dissolution à son volume primitif puis dilué au 1/10°. L'adsorption est réalisée selon la technique déjà décrite. Les meilleurs résultats pour une préparation diastasique ainsi purifiée (extrait 7,8 p. 100) ont été les suivants :

Alumine B — adsorption de 25 p. 100 au pH.....	4,8
Alumine A — adsorption de 19 p. 100 au pH.....	4,8

III. — Adsorption du suc préalablement traité par le carbonate de sodium.

Le suc traité par un égal volume d'une solution normale de carbonate de sodium, selon la technique indiquée au chapitre des précipitations, ne nous a pas permis de réaliser de bonnes adsorptions quels que fussent la dilution utilisée, la réaction du milieu, la nature de l'adsorbant et sa proportion. Il semble que la trop grande quantité d'électrolytes contenue dans nos préparations diastasiques ait gêné considérablement l'adsorption.

IV. — Adsorption du suc préalablement traité par le carbonate de sodium puis par deux précipitations acétoniques.

Les résultats obtenus ont été un peu plus satisfaisants que les précédents.

Les essais d'adsorption ont été effectués à divers pH, avec une suspension d'alumine B dont les caractéristiques étaient les suivantes.

10 cm³ de cette suspension d'alumine B fournissent

- 1° Un extrait sec à 100°-110°..... 0 g.,456
- 2° Un résidu Al₂O₃ après calcination..... 0 g.,360

a) *Préparation du suc purifié.* — 60 cm³ de Nuoc'Son sont traités par un volume égal d'une solution de carbonate de sodium, d'après la technique indiquée précédemment.

Le liquide actif obtenu par centrifugation est précipité par un égal volume d'acétone ; après une nouvelle centrifugation, le précipité est ramené avec de l'eau à son volume primitif, puis de nouveau précipité par un égal volume d'acétone, ce précipité recueilli par centrifugation redissous dans un peu d'eau, est desséché dans le vide sulfurique, pour chasser l'acétone, il est ensuite ramené à son volume primitif avec de l'eau distillée. Le pH de ce suc ainsi purifié est de 9.

b) *Obtention des divers pH.* — Des essais préliminaires nous ont permis d'établir les pH ci-dessous en utilisant l'acide acétique dilué au 1/10.

- 10 cm³ de suc ainsi purifié + 0 cm³ d'ac. acétique au 1/10
+ eau q. s. p. 15 cm³ donnent un pH = 9
- 10 cm³ de suc ainsi purifié + 0 cm³,5 d'ac. acétique au 1/10
+ eau q. s. p. 15 cm³ donnent un pH = 8
- 10 cm³ de suc ainsi purifié + 1 cm³ d'ac. acétique au 1/10
+ eau q. s. p. 15 cm³ donnent un pH = 6,5
- 10 cm³ de suc ainsi purifié + 1 cm³,5 d'ac. acétique au 1/10
+ eau q. s. p. 15 cm³ donnent un pH = 5,9
- 10 cm³ de suc ainsi purifié + 2 cm³ d'ac. acétique au 1/10
+ eau q. s. p. 15 cm³ donnent un pH = 5,2
- 10 cm³ de suc ainsi purifié + 2 cm³,5 d'ac. acétique au 1/10
+ eau q. s. p. 15 cm³ donnent un pH = 4,6

c) *Adsorption.* — L'adsorption de ces diverses préparations diastasiques à des pH différents, est réalisée de la façon suivante : 10 cm³ de la suspension d'alumine placés dans un tube à centrifugation, sont longuement centrifugés.

Le culot d'alumine ainsi obtenu est remis en suspension dans la préparation de laccase elle même, aux pH obtenus comme ci-dessus.

Après une agitation mécanique d'une demi-heure, chaque essai est centrifugé, et on mesure l'activité du liquide surnageant.

La quantité de la laccase disparue, mesure son adsorption.

RÉSULTATS ET COURBE REPRÉSENTATIVE. — Les résultats sont indiqués dans le tableau suivant :

	Unités diasta- siques U.	Unités diasta- siques fixées U'.	$\frac{U'}{U} \times 100$
Suc purifié.....	1.600	—	—
Suc adsorbé au pH = 9	1.250	350	21,8
— aa pH = 8	900	700	43,7
— au pH = 6,8	1.050	550	37,3
— au pH = 5,95	950	650	40,6
— au pH = 5,2	1.125	475	29,5
— au pH = 4,6	1.125	475	29,6

et voici la courbe représentative de cette adsorption en fonction du pH.

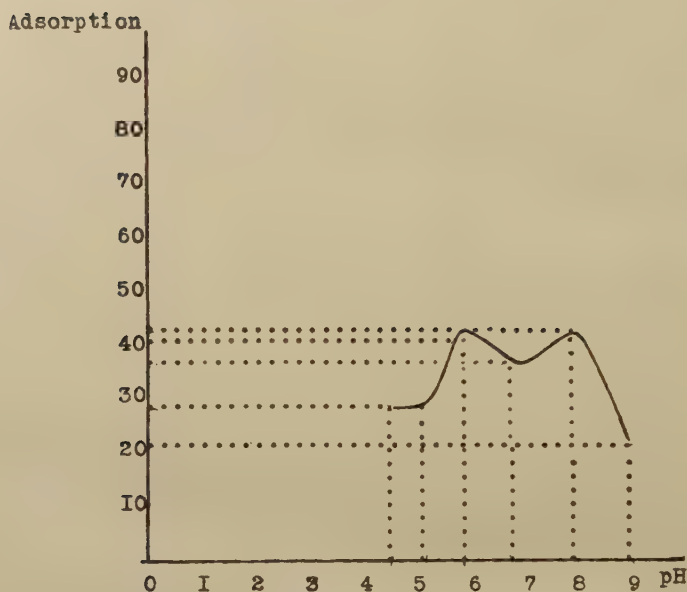


FIGURE I.

V. — Adsorption par l'alumine B du suc purifié
par le carbonate de sodium et par dialyse.

Continuant toujours notre étude systématique, nous avons soumis à l'adsorption par l'alumine B, des sucres traités par le carbonate de sodium et dialysés pendant trois jours.

La technique utilisée a été toujours la même, c'est-à-dire la suivante : 10 cm³ de suc purifié sont agités mécaniquement pendant une demi heure avec le culot de centrifugation provenant de 10 cm³ d'une suspension d'alumine. Après centrifugation et séparation de l'adsorbat, la différence d'activité qui existe entre le suc purifié et le suc après action de l'alumine mesure l'adsorption.

ESSAIS PRÉLIMINAIRES. — Voici deux expériences préliminaires qui nous ont donné d'excellents résultats (le pH n'a pas été pris en considération) :

1° *Expérience.*

Adsorption 80 p. 100

Caractéristiques du suc avant adsorption.

Extrait sec 5 g.,88 p. 100

Concentration diastasique (U. D. pour 100 cm³).. 1.200

pH 6

Caractéristiques du liquide après adsorption.

Extrait sec 1 g.,20 p. 100

Concentration diastasique (U. D. pour 100 cm³).. 250

2° *Expérience.*

Effectuée avec un suc différent.

Adsorption 85 p. 100

Caractéristiques du suc avant adsorption.

Extrait sec 4 g.,91 p. 100

Concentration diastasique (U. D. pour 100 cm³).. 1.160

Caractéristiques du suc après adsorption.

Extrait sec 1 g.,07 p. 100

Concentration diastasique (U. D. pour 100 cm³)... 160

Ces deux expériences nous ayant donné des résultats très encourageants nous avons entrepris une étude approfondie de cette adsorption.

1° *Essai d'adsorption par l'alumine B du suc carbonaté et dialysé.*

a) PRÉPARATION DU SUC DIALYSÉ. — Le suc est traité par un volume égal de solution normale de carbonate de sodium et soumis à une dialyse prolongée pendant cinq jours à travers une membrane de cellophane de 1/10^e de mm. d'épaisseur environ, en utilisant le dialyseur classique de GRAHAM contre de l'eau distillée renouvelée 3 fois par jour. Nous avons utilisé deux dialyseurs, dans chacun d'eux nous avons placé 50 cm³ de suc carbonaté actif. Au bout de cinq jours le liquide recueilli dans les

deux dialyseurs avait un volume total de 300 cm³. La réaction du milieu qui était alcaline au début, pH 9 était devenue presque neutre, le pH étant de 6,5.

b) OBTENTION DES DIVERS pH. — Nous avons par des essais préliminaires fixé les proportions d'acide acétique ou de carbonate de sodium nécessaires pour pouvoir faire varier le pH dans les plus grandes limites possibles.

Voici les pH que nous avons fixés et qui ont été mesurées colorimétriquement.

10 cm ³ suc dialysé + 0 cm ³ ,6 eau distillée	témoin
10 cm ³ suc dialysé + 0 cm ³ ,6 sol. CO ₃ Na ₂ N.....	pH = 9,7
10 cm ³ suc dialysé + 0 cm ³ ,3 sol. CO ₃ Na ₂ N + 0 cm ³ ,3 eau distillée	pH = 8
10 cm ³ suc dialysé + 0 cm ³ ,6 eau distillée	pH = 6,5
10 cm ³ suc dialysé + 0 cm ³ ,3 sol. ac. acét. au 1/10 + 0 cm ³ ,3 eau.	pH = 5,2
10 cm ³ suc dialysé + 0 cm ³ ,6 sol. ac. acét. au 1/10	pH = 4,2

c) MODE OPÉRATOIRE. — A 10 cm³ de suc carbonaté et dialysé, nous avons ajouté une quantité déterminée de solution normale de carbonate de sodium ou d'acide acétique au 1/10 pour avoir les différents pH indiqués ci-dessus. Cette solution à pH ainsi déterminée est agitée avec le culot d'alumine, provenant de la centrifugation de 10 cm³ d'une suspension d'alumine B.

Après une agitation mécanique d'une heure, nous avons mesuré l'activité du liquide surnageant après centrifugation.

Nous avons d'autre part, mesuré l'activité du suc placé dans les mêmes conditions (témoin) c'est-à-dire 10 cm³ de ce même suc purifié par le carbonate de sodium et dialysé, auquel on a ajouté 0 cm³,6 d'eau (1). La différence entre l'activité de ce témoin et celle du liquide surnageant après action de l'alumine B, mesurera l'adsorption.

Remarque. — Pour toutes les mesures d'activité on ramène les solutions diastasiques au pH 6,7 avec un

(1) Ce volume d'eau ajouté au témoin représente le volume de réactif ajouté, dans les expériences précédentes pour ajuster leur pH.

mélange tampon phosphate de sodium, phosphate de potassium et on opère à la température de 30°, pendant le temps de 10'.

RÉSULTATS ET COURBE REPRÉSENTATIVE.

Voici les résultats obtenus :

Témoins	Unités diasta- siques U_0	Unités diasta- siques U' fixées	$\frac{U'}{U} \times 100$
Suc dialysé.....	1.000	—	—
Suc dialysé ramené au pH = 6,5	1.010	—	—
— — pH = 4,4	1.010	—	—
Après adsorption liquide surnageant.			
Suc dialysé adsorbé au pH = 9,7	360	640	64
— — pH = 8	640	360	36
— — pH = 6,5	200	800	80
— — pH = 5,2	0	1.000	100
— — pH = 4,2	92	908	90,8

On voit d'après ce tableau que l'adsorption est complète pour le suc ainsi préparé au pH 5,2.

Le A. W. est de 218 (1).

Les caractéristiques du suc soumis à cette adsorption étaient les suivantes :

Extrait sec 1 g.,850 p. 100
Cendres sulfatées 0 g.,235 p. 100
(traces de SO_4Na_2).

(1) Pour la définition du A. W. voir page 143.

Voici la courbe représentative de cette adsorption.

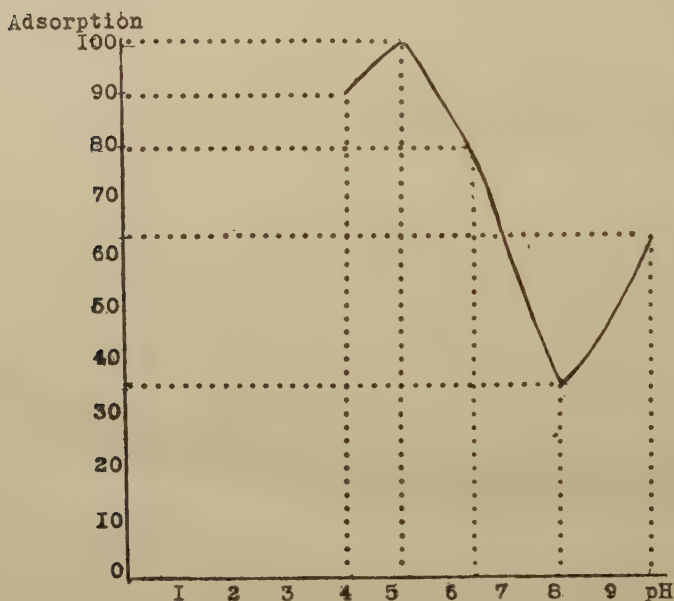


FIGURE II.

D'après ces résultats, quel que soit le pH de la préparation diastasique, entre 4,2 et 9,7, il y a toujours adsorption. Nous n'avons pas fait d'essais d'adsorption, à des pH inférieurs à 4,2 et à des pH supérieurs à 9,7, car notre diastase ainsi purifiée était devenue plus labile et ne nous a pas paru supporter de telles variations de milieu sans grandes pertes d'activité.

II. — *Essai d'adsorption d'un suc carbonaté dialysé par l'alumine B.*

Pour bien montrer que l'adsorption complète réalisée précédemment n'est pas un fait isolé, nous avons réalisé le même essai en partant d'un autre suc.

60 cm³ de suc (Nuoc'Son) traités par un égal volume de solution normale de carbonate de sodium sont soumis à la dialyse pendant 5 jours. L'eau de dialyse est renouvelée 15 fois.

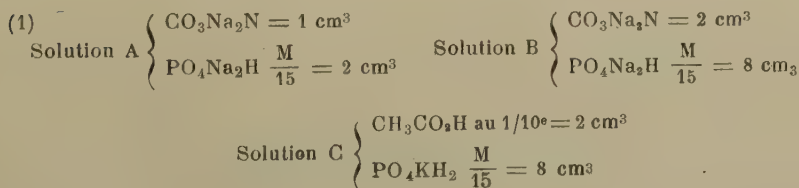
Suc dialysé obtenu.....	350 cm ³
Caractéristiques du suc dialysé.....	pH = 6,35
Concentration diastasique (U.D. pour 100 cm ³).....	640
Extrait sec.....	1 g.,960
Cendres sulfatées.....	0 g.,190

a) OBTENTION DES DIVERS pH. — Toujours par des essais préliminaires, nous avons déterminé les quantités d'acide acétique, de carbonate de sodium ou d'un mélange tampon, nécessaire pour faire varier le pH, dans des limites suffisamment étendues. Voici les pH fixés :

10 cm ³ suc dialysé + 0 cm ³ ,3 sol. CO ₃ Na ₂ N.....	pH = 9,7
10 cm ³ suc dialysé + 0 cm ³ ,1 sol. CO ₃ Na ₂ N + 0 cm ³ ,2 H ₂ O.....	pH = 7,4
10 cm ³ suc dialysé + 0 cm ³ ,3 solution B (1).....	pH = 8,0
10 cm ³ suc dialysé + 0 cm ³ ,3 solution A (1).....	pH = 6,7
10 cm ³ suc dialysé + 0 cm ³ ,3 solution C (1).....	pH = 5,7
10 cm ³ suc dialysé + 0 cm ³ ,1 sol. ac. acét. au 1/10 + 0 cm ³ ,2 H ₂ O.....	pH = 4,4

Nous avons vérifié que de telles variations de pH sont sans influence sur l'activité du suc dialysé.

b) MODE OPÉRATOIRE. — Le culot de centrifugation de 10 cm³ de suspension d'alumine B, est agité pendant une heure, avec 10 cm³ de suc dialysé à un pH déterminé. Après une nouvelle centrifugation, l'activité est mesurée dans le liquide surnageant. La différence entre l'activité du suc dialysé et celle du suc après adsorption donnera l'activité adsorbée.



Caractéristiques du suc purifié soumis à l'adsorption.

Extrait sec 2 g.,010 p. 100
 Cendres sulfatées 0 g.,255 p. 100
 (Traces de CO_3Na_2).

RÉSULTATS ET COURBE REPRÉSENTATIVE :

Témoins	Unités diasta- siques U.	Unités diasta- siques U' fixées	$\frac{U'}{U} \times 100$
Suc dialysé.....	640	—	—
Suc dialysé au pH = 9,4	628	—	—
Suc dialysé ramené au pH = 4,4	620	—	—
Après adsorption liquide surnageant			
Suc dialysé adsorbé au pH = 9,4	300	340	53,1
— — pH = 8	280	360	56,2
— — pH = 6,7	300	340	53,1
— — pH = 6,3	100	540	84,3
— — pH = 5,7	30	610	95,3
— — pH = 4,4	0	610	100

L'adsorption du suc purifié est complète au pH = 4,4.
 Le A. W. est de 140.

Voici la courbe représentative de cette adsorption en fonction du pH.

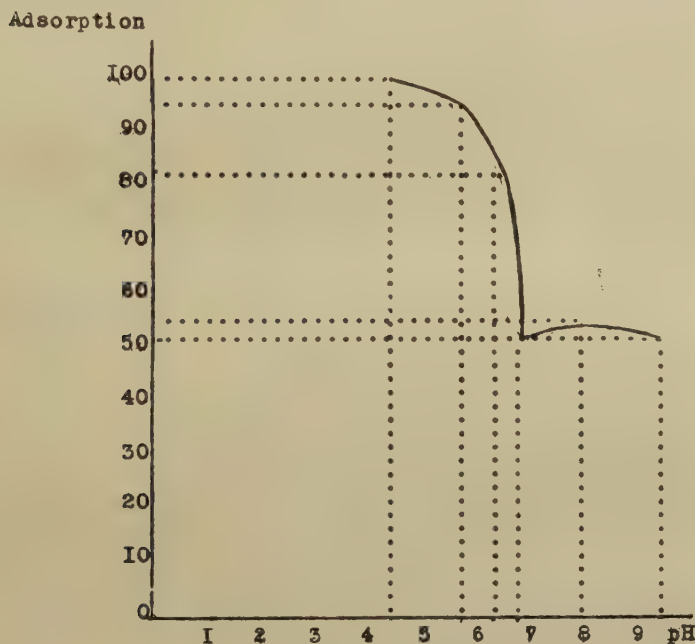


FIGURE III.

On voit que cette courbe présente sensiblement la même allure que la précédente, de nouveau on peut constater une adsorption quel que soit le pH (entre 4,4 et 9,7) mais toutefois très variable selon le pH.

ETUDE DE L'ADSORPTION EN FONCTION DU TEMPS ET EN FONCTION DE LA QUANTITÉ D'ALUMINE B.

Connaissant un ensemble de conditions suffisantes pour réaliser une adsorption complète nous avons cru intéressant avant d'étudier l'éluion, de faire des essais d'absorption soit en fonction du temps, soit en fonction de la quantité d'adsorbant utilisé.

a) *Adsorption en fonction du temps.* — Dans les deux essais précédents, l'adsorption complète a été réalisée, pour un suc purifié, à un pH déterminé, après une agitation mécanique d'une heure.

Nous avons fait avec ces mêmes suc et au pH convenable des essais d'adsorption en réduisant le temps d'agitation. Pour un suc dialysé dont la concentration diastatique était de 4.100 pour 10 cm³, l'activité du liquide surnageant est devenue nulle au bout de vingt minutes d'agitation avec la suspension d'alumine B (voir page 130).

D'autres essais nous ont donné des résultats analogues — un contact de vingt minutes était suffisant pour réaliser l'adsorption intégrale.

b) *Adsorption en fonction de la quantité d'alumine B.*
— L'étude de l'adsorption en fonction de la quantité d'alumine B revient en somme à l'étude de la valeur d'adsorption (A. W.) qui est, pour la préparation diastatique déterminée, le nombre d'unités diastatiques adsorbées par un gramme d'adsorbant. La suspension d'alumine B, utilisée est celle qui nous a servi précédemment, ses caractéristiques étaient les suivantes :

- | | |
|-------------------------------|--------------------|
| 1. Extrait sec 100-110° | 4 g.,560 par litre |
| 2. Après calcination | 3 g.,360 par litre |

A. W. est fonction, pour une préparation diastatique déterminée, de la quantité d'adsorbant, ou ce qui revient au même, pour une quantité déterminée d'adsorbant de la quantité de préparation diastatique utilisée.

Nous avons effectué des adsorptions au pH optimum 4,4 en utilisant des quantités double et triple de préparation diastatique, et en maintenant fixe la quantité d'alumine B.

Voici les résultats trouvés.

- I. — 10 cm³ suc purifié adsorbé par 10 cm³ suspension alumine au pH = 4,4
Temps d'agitation : 30' adsorption 100 p. 100 — A.W. = 140.
- II. — 20 cm³ suc purifié adsorbé par 10 cm³ suspension alumine au pH = 4,4
Temps d'agitation : 30' adsorption 100 p. 100 — A.W. = 280.
- III. — 20 cm³ suc purifié adsorbé par 10 cm³ suspension alumine au pH = 4,4
Temps d'agitation : 30' adsorption 100 p. 100 — A.W. = 280.
- IV. — 30 cm³ suc purifié adsorbé par 18 cm³ suspension alumine au pH = 4,4
Temps d'agitation : 30' adsorption 60 p. 100 — A.W. = 275.

On voit d'après ce tableau que la « saturation » de l'alumine ne se produit qu'à partir de 20 cm³ de suc purifié.

Conclusions. — Nous avons ainsi fixé les conditions nécessaires pour réaliser une adsorption totale par l'alumine B. de l'activité diastasique du suc préalablement purifié par le carbonate de sodium et par dialyse.

Cette adsorption est maximum pour une réaction acide du milieu pH compris entre 4 et 5) mais le pH optimum est variable selon le suc utilisé et ses caractéristiques ; d'ailleurs l'adsorption existe, plus ou moins marquée, quel que soit le pH où l'on opère.

ELUTION DE LA LACCASE ADSORBÉE. — L'adsorption complète de la laccase par l'alumine B étant réalisée et ses modalités connues, nous allons passer à la deuxième partie du problème, celui de l'élution de la laccase.

Il semble, d'après les courbes précédemment établies, que pour réussir à éluer la laccase, il suffit d'agiter l'adsorbat qui la contient avec des solutions dont le pH soit situé au delà des limites où s'est effectuée l'adsorption, en opérant par conséquent à un pH inférieur à 4,4 ou bien à un pH supérieur à 9,4 on devrait avoir des résultats satisfaisants.

Des essais d'élution effectués avec des solutions légèrement ammoniacales, n'ont cependant pas donné de

bons résultats. Avec des solutions alcalinisées par le carbonate de sodium, les résultats ont été relativement faibles. Mais nous avons obtenus de bons rendements avec des mélanges tampons de phosphate de sodium et carbonate de sodium.

Essais d'élution.

Avec le suc précédent (page 142) pour lequel l'adsorption par l'alumine B était de 100 p. 100 au $\text{pH} = 4,4$ A. W. = 280.

Nous avons effectué d'abord l'adsorption totale.

Adsorption. — 20 cm^3 de suc carbonaté purifié par dialyse sont agités avec un culot d'alumine B, provenant de 100 cm_3 d'une suspension d'alumine B au $\text{pH} = 4,4$. L'adsorption a été totale, c'est-à-dire qu'après centrifugation, le liquide surnageant était inactif. Ces 20 cm_3 de préparation diastasique renfermaient 128 U. D.

Elution I. — L'élution a été réalisée de la façon suivante : Le culot d'alumine centrifugé — qui est en somme l'adsorbat, — est agité mécaniquement pendant une demi-heure avec 10 cm^3 d'une solution de phosphate disodique $\frac{\text{M}}{30}$ ($\text{pH} = 8,2$). Après centrifugation et séparation du liquide surnageant, l'adsorbat est traité une deuxième fois de la même façon. Les deux liquides surnageants amenés à un volume de 20 cm^3 renfermaient 73 unités diastases, ce qui équivaut à une élution de 57 p. 100.

2° En suivant la même technique nous avons effectué un autre essai, dans lequel le pH du liquide éluant est un peu plus élevé et voisin du $\text{pH} = 9,5$ ce pH est obtenu par un mélange de phosphate de sodium et carbonate de sodium dans les proportions suivantes :

Sol. phosphate disodique $\frac{\text{M}}{15}$ =	4 cm^3
Sol. carbonate de sodium N =	1 cm^3
Eau q. s. p.	10 cm^3

Après une adsorption totale à $\text{pH} = 4,4$, de 128 unités diastasiques, nous avons obtenu après élution, 92 unités diastasiques ce qui équivaut à une élution de 72 p. 100.

3° Un autre essai fut réalisé sur un suc purifié, différent.

Adsorption. — 50 cm^3 de suc purifié sont adsorbés par un culot d'alumine provenant de 28 cm^3 de suspension d'alumine B à $\text{pH} = 4,4$. L'adsorption a été de 90 p. 100 et représente 310 unités diastasiques.

Elution. — Réalisée comme précédemment l'élution nous a donné 222 unités diastasiques ce qui représente un taux de 71 p. 100.

Nous avons fait de très nombreux essais d'élution en élevant le pH (obtenu par mélange de soude normale et de phosphate de sodium) jamais nous n'avons pu réaliser une élution supérieure à 75 p. 100. D'ailleurs ces pH si élevés ne sont pas sans action sur l'activité de laccase, à ce degré de pureté.

Comment expliquer cette élution incomplète ? Doit-on supposer une perte de l'activité ? Des mesures d'activité, faites sur l'adsorbat lui même après adsorption totale, nous ont montré que l'on retrouve sur cet adsorbat l'activité première.

Existe-t-il une partie de la diastase qui n'est pas éluable ? Les courbes des adsorptions établies précédemment permettent de faire cette hypothèse, puisqu'il y a adsorption à tous les pH .

ADSORPTION SUR ALUMINE A ET ALUMINE C.

Nous avons fait de nombreux essais d'adsorption avec les alumines A et C, nous avons trouvé des résultats sensiblement identiques, une adsorption complète fut toujours suivie d'une élution incomplète dont le taux ne dépassa pas 75 p. 100. Nous croyons inutile d'allonger ce travail en exposant en détail tous ces essais.

PURIFICATION DE LA LACCASE PAR ADSORPTION
ET ÉLUTION.

L'étude de l'adsorption et de l'élution étant réalisée nous avons étudié les variations du fer et du manganèse au cours de la purification de la laccase.

Voici un essai réalisé avec l'alumine B. — 50 cm³ de suc sont purifiés par action du carbonate de sodium et par dialyse, puis adsorbés au pH 4,4 par le culot d'alumine B (provenant de 28 cm³ d'une suspension d'alumine B, renfermant à peu près 1 g. d'alumine exprimée en Al₂O₃).

L'adsorption a été de 90 p. 100. L'élution réalisée à pH 9,5 avec une solution tampon (mélange de sol. de carbonate de sodium N et phosphate de sodium $\frac{M}{15}$) a donné une élution de 72 p. 100.

Voici les résultats trouvés pour l'extrait sec, les cendres sulfatées et la teneur en fer et en manganèse.

La solution après élution est ramenée à 50 cm³.

	Concentration diastasique C. D.	Extrait sec en g. p. 100 cm ³	Cendres sulfatées en g. p. 100 cm ³	Fer en mg. p. 100 cm ³	Manganèse en mg. p. 100 cm ³	Activité C. D. extrait sec	Titre en Mn Mn en γ U. D.
Suc traité par le carbonate de sodium et dialysé ..	640	1,875	0,320	0,30	0,08	342	0,124
Après adsorp. à pH = 4,4 et élution à pH = 9,5..	414	0,795	0,251	0,19	0,02	517	0,048

Les cendres sulfatées renferment des traces d'alumine.

Voici un autre essai réalisé avec l'alumine C. — Le suc purifié par précipitation au moyen du carbonate de sodium et dialysé a été adsorbé par l'alumine C, l'adsorption à $\text{pH} = 4,8$ a été de 80 p. 100, et l'élution à $\text{pH} = 9,5$ a été de 70 p. 100.

Voici les résultats trouvés :

	Concentration diastasique	Extrait sec en g p. 100 cm ³	Cendres sulfatées en g. p. 100	Fer en mg. p. 100 cm ³	Manganèse en mg. p. 100 cm ³	Activité C. D. extrait sec	Titre en Mn Mn en γ U. D.
Suc traité par le carbonate de sodium et dialysé ..	700	1,981	0,450	0,49	0,12	352	0,17
Après adsorp. à $\text{pH} = 4,9$ et élution à $\text{pH} = 9,5$..	392	0,402	0,209	0,22	0,03	980	0,076

Les cendres sulfatées renferment de l'alumine.

Dans les deux cas, il y a donc une augmentation très nette de l'activité et une diminution marquée du titre en manganèse.

CONCLUSIONS SUR L'ADSORPTION.

Les adsorptions de laccase peuvent être totales, il en est ainsi avec les sucs purifiés successivement par le carbonate de sodium, puis par dialyse. L'élution au contraire n'est jamais totale. Le meilleur résultat obtenu est une élution de 75 p. 100 ce résultat tient vraisemblablement à ce qu'une adsorption au moins partielle se produit toujours quel que soit le pH. L'adsorption des préparations diastasiques déféquées au carbonate de sodium et dialysées, suivie de leur élution permet comme les autres méthodes antérieurement étudiées d'obte-

nir des préparations, dont l'activité est nettement augmentée, et dont le titre en manganèse est fortement abaissé.

Il aurait été intéressant de faire des essais d'adsorption sur des sucres de plus en plus purs, tel que des sucres purifiés par le sulfate d'ammonium, mais le temps nous a manqué pour réaliser ces essais.

TROISIÈME PARTIE.

Purification de la laccase par des méthodes associées.

Variation du fer et du manganèse au cours de cette purification.

Dans les chapitres précédents, nous avons montré les résultats que pouvaient donner les diverses méthodes quand on appliquait chacune d'elles en particulier, à la purification des préparations diastasiques de suc d'arbre à laque.

Dans cette troisième partie, nous rapportons les résultats obtenus en appliquant successivement à un même échantillon de suc plusieurs de ces techniques.

En réalité, nous nous étions déjà inspirés de cette idée sous la pression même des circonstances dans les chapitres précédents, puisque nous avons montré que la défécation au carbonate de sodium était une opération préliminaire indispensable pour l'application de toutes les autres techniques étudiées (action de sulfate d'ammonium, dialyse, ultrafiltration, adsorption et élution). En ce qui concerne l'adsorption elle-même, nous avons constaté que notre suc pour être adsorbé devait, après action du carbonate de sodium, être soumis à la dialyse. Ce qui nous amenait en somme, à purifier notre préparation à l'aide de quatre opérations successives : précipitation

par le carbonate de sodium, dialyse, adsorption, élution. Nous allons donner dans cette dernière partie, quelques résultats obtenus en associant quelques méthodes entre elles.

Après avoir ainsi obtenu des préparations diastasiques aussi pures que possible dans lesquelles le fer et le manganèse ne peuvent plus (ou presque plus) être mis en évidence par nos réactifs nous ajouterons ces deux métaux en quantité déterminée et nous examinerons leur influence sur l'activité de la diastase. Cette façon de procéder n'est pas, il est vrai, à l'abri de certaines critiques. Si le fer et le manganèse ajoutés dans ce cas se montrent inactifs, on peut toujours objecter que ce résultat négatif est dû à ce que ces deux métaux surajoutés ne se trouvent pas sous la forme nécessaire à l'activité de la laccase. Cette méthode synthétique, aura tout au moins pour résultat de délimiter le problème comme nous le verrons plus loin.

Comme dans les chapitres précédents, à chaque étape de la purification de nos préparations, nous aurons soin de mesurer le rendement en activité de la nouvelle préparation diastatique obtenue, ainsi que sa teneur en fer et en manganèse. Comme critère de purification d'une diastase, nous utilisons la notion d'activité déjà défini pages 65 et 66 qui est le rapport $\left(\frac{CD}{\text{Extrait sec}} \right)$.

Ce rapport nous paraît être le témoin le plus fidèle pour suivre la purification d'une diastase. Pratiquement on se heurte à des difficultés dues à la fragilité de la diastase qui augmente au cours des manipulations de purification.

En même temps nous établirons le titre en manganèse c'est à dire le rapport $\frac{\gamma \text{ Mn}}{U.D}$ défini pages 65 et 66, et doserons le fer, quand la quantité de préparation diastatique le permettra.

Si à chaque étape de la purification on élimine du fer et du manganèse, sans perte d'activité, le rôle de ces

deux métaux dans l'activité diastasique devient ainsi moins probable.

Cependant il ne nous sera jamais possible d'établir leur élimination complète, nous serons toujours arrêtés par la limite de sensibilité de leurs réactions qui sont en valeur absolue avec les méthodes que nous avons utilisées, de 0 mg.,001 pour le manganèse et 0 mg.,01 pour le fer (1), les prises d'essai se trouvent d'autre part limitées par des nécessités d'ordre expérimental.

I. — Purification de la laccase en associant à la précipitation par le carbonate de sodium la précipitation acétonique.

L'association de ces deux méthodes nous a paru utile dans la purification de nos préparations de laccase. La première, précipitation par le carbonate de sodium élimine comme nous l'avons déjà vu, une grande partie de substances étrangères et une grande quantité de manganèse ; la seconde la précipitation acétonique élimine de son côté les substances qui sont solubles dans l'acétone.

Voici les schémas de deux essais que nous avons effectués ; les techniques de ces deux précipitations sont les mêmes que celles que nous avons indiqués dans les chapitres précédents.

Nous n'avons pas étudié la répartition du fer dans les divers précipités ainsi obtenus.

Tous les résultats sont consignés dans les tableaux ci-dessous.

Les deux essais identiques comme technique opératoire mais pourtant sur deux sucés différents, sont désignés par les lettres A et B.

(1) Cette différence de limite de sensibilité, d'une part, la limitation des prises d'essais d'autre part, expliquent pourquoi, dans nos purifications nous avons tout spécialement étudié le manganèse (rapport $\frac{\text{Titre Mn}}{\text{U. D.}}$) et négligé bien à regret, une étude identique pour le fer.

1° **Suc dilué au demi** (activité - extrait sec - cendres sulfatées - Manganèse).

2° *Suc non dilué 20 cm³ + Solution normale de carbonate de soude 20 cm³*

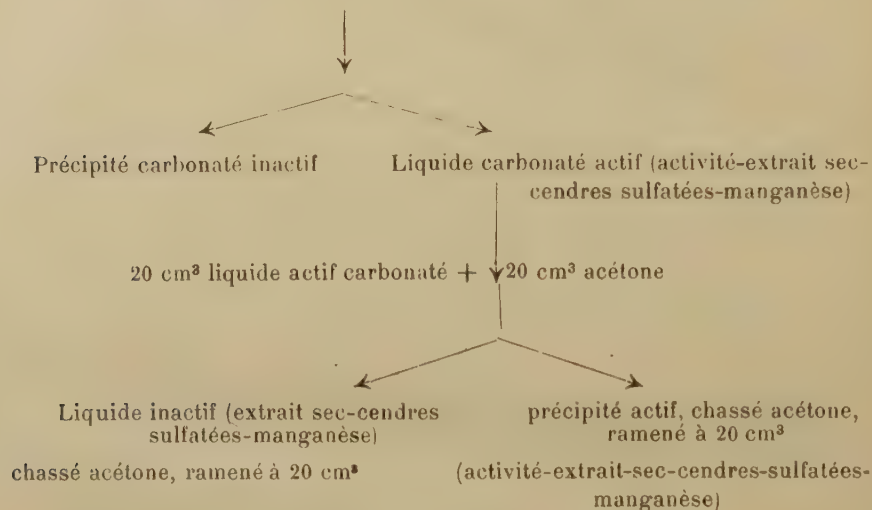


TABLEAU I.

	Cone diastasi- C. D. (U. D. p. 100 cm ³)	Extrait sec en g. 100 cm ³	Activité C. D. extrait sec	Cendres sulfatées en g. p. 100 cm ³	Manganèse en mg. p. 1000 cm ³	Titre en Mn. Mn en γ U. D.
Suc dilué au 1/2	966	19,225	50,3	1,650	30,5	31,5
Suc dilué au 1/2 par addition de son volume de carbonate et centrifugé	863	20,200	42,7	1,225	2,75	3,18
A { Précipité acétonique prove- nant de 20 cm ³ de suc car- bonaté redissous ramené à 100 cm ³	840	15,540	54,1	2,650	2,6	3,09
Liquide acétonique.....	0	7,082	—	2,015	0,2	—
Suc dilué au 1/2.....	1.023	18,800	54,4	1,600	35,7	34,9
B { Suc carbonaté.....	892	20,325	43,9	3,850	1,32	1,48
Précipité cétonique.....	853	14,550	58,8	2,125	1,31	1,53
Liquide cétonique.....	0	5,250	—	1,725	0,25	—

Dans ces deux expériences, nous constatons une perte d'activité qui est comprise entre 10 et 15 p. 100 et la quantité de manganèse éliminée est très importante, elle représente 92 à 95 p. 100 de la teneur en manganèse. Le rapport $\frac{\text{Mn}}{\text{UD}}$ a diminué considérablement.

Nous pouvons donc conclure qu'il est possible d'éliminer de grandes quantités de manganèse sans modifier l'activité de la laccase.

Il n'y a pas lieu dans ces expériences, d'envisager le rapport $\frac{\text{CD}}{\text{Extrait sec}}$ car l'extrait sec, malgré la précipitation par l'acétone renferme de grandes quantités de carbonate de sodium.

II. — Purification de la laccase après défécation au carbonate de sodium, par ultrafiltration, adsorption et élution.

Voici les résultats obtenus dans l'un de ces essais :

Un échantillon de suc (Nuoc'Son) est traité par le carbonate de sodium on obtient après centrifugation 180 cm³ d'un liquide surnageant, contenant 5.170 unités diastasiques.

Ces 180 cm³ de liquide sont ultrafiltrés à pH = 4,9 avec lavage prolongé à l'eau, la partie non ultrafiltrée, ramenée au volume de 50 cm³ renferme 5.020 unités diastasiques.

Un essai préliminaire d'adsorption à pH = 4,8 portant sur 10 cm³ du suc ultrafiltré, nous a montré que l'adsorption était totale en utilisant un çulot d'alumine B (correspondant à environ 0 g.,4 de Al₂O₃) l'élution à pH 9,2 avec 10 cm³ d'un mélange à volumes égaux de solution de carbonate de sodium et de solution de phosphate disodique M/15 nous a donné un rendement de 75 p. 100.

Les 40 cm³ d'ultrafiltrat, représentant 4.016 unités

diastasiques, sont alors adsorbés par un culot d'alumine B, représentant une quantité quatre fois plus forte que dans l'essai précédent, à $\text{ph} = 4,8$, sous un volume total de 100 cm^3 , par une agitation mécanique qui a duré une heure. L'adsorption a été totale. L'élution a été obtenue en traitant l'adsorbat d'alumine par 40 cm^3 d'un mélange de solution normale d'une solution de carbonate de sodium et de solution de phosphate de sodium M/15 elle a donné un rendement de $70 \text{ p. } 100$.

Les 40 cm^3 élués renfermaient 2.810 unités diastasiques.

RÉSULTATS :

Voici les résultats ramenés à 100 cm^3 ainsi que la teneur en extrait sec, cendres sulfatées, fer et manganèse.

TABLEAU II.

	Concentration diastasique C. D.	Extrait sec en g. p. 100 cm^3	Activité C. D. extrait sec	Cendres sulfatées en g. p. 100 cm^3	Manganèse en mg. p. 100 cm^3	Titre en Mn Mn en γ U. D.	Fer en mg. p. 100 cm^3
Suc dilué au 1/2.....	3.100	11,92	260	3,04	19,5	6,3	3,0
Suc carbonaté	2 875	14,80	192	5,95	0,95	0,33	0,35
Suc non ultrafiltrable....	10,040	4,90	2.048	0,410	0,25	0,025	—
Suc adsorbé élué.....	7.027	5,20	1 351	0,620	0,14	0,020	—

A une partie du suc ainsi purifié, nous avons ajouté 0 mg.,05 de fer sous forme de sulfate ferreux, sans obtenir une augmentation d'activité, à une autre partie nous avons ajouté 0 mg.,05 de manganèse sous forme de sulfate de manganèse, l'activité est encore restée invariable.

III. — Purification de la laccase, après défécation au carbonate de sodium, par précipitation au sulfate d'ammonium et ultrafiltration.

1^{re} *essai*. — 100 cm³ de suc (Nuoc'Son) dilués sont traités à froid pour 100 cm³ de solution normale de carbonate de sodium après centrifugation 150 cm³ de liquide carbonaté surnageant sont amenés par addition d'acide acétique au 1/10 au pH = 7 puis précipités par une solution saturée de sulfate d'ammonium (1500 cm³ à la glacière pendant deux jours). Le précipité recueilli sur filtre de Buchner est dissous dans 60 cm³ d'eau distillée (première concentration).

Voici les résultats obtenus :

TABLEAU III.

	Concentration diastasique C. D. U. D. p. 100 cm ³	Extrait sec en g. p. 108 cm ³	Activité C. D. extrait sec	Cendres sulfatées en g. p. 100 cm ³	Manganèse en mg. p. 100 cm ³	Titre en Mn Mn en γ U. D.
Suc dilué au 1/2.....	3.300	10,95	305	1,175	22,05	6,67
Suc carbonaté.....	3.120	13,45	240	2,850	2,05	0,64
Suc précipité par So ₄ Am ₂	5.100	1,60	3.187	0,012	0,20	0,039
Suc non ultrafiltrable.	7,700	0,75	10.266	0,009	0,05	0,006

L'activité du suc ainsi purifié n'est pas modifiée par addition de fer (sous forme de sulfate ferreux) ou de manganèse (sous forme de sulfate de manganèse).

Il faut noter que la perte en activité au cours de la purification est considérable, ainsi les 150 cm³ de suc carbonaté renfermaient avant la précipitation par le sulfate d'ammonium 4.680 unités diastasiques ; après préci-

pitation et concentration des 60 cm³ de suc provenant de la précipitation par le sulfate d'ammonium renferment 3.060 unités diastasiques et après ultrafiltration les 30 cm³ de non-ultrafiltrat renferment 2.310 unités diastasiques. On voit qu'après toutes ces manipulations l'activité a baissé de 50 p. 100.

2° *essai*. — Le suc dilué est traité par un égal volume de solution normale de carbonate de sodium, après centrifugation 120 cm³ de liquide carbonaté sont amenés au pH 7 par l'acide acétique dilué au 1/10 puis précipités par 120 cm³ d'une solution saturée de sulfate d'ammonium.

Après deux jours de contact à la glacière, le précipité recueilli sur filtre Buchner, est dissous dans 40 cm³ d'eau puis soumis à l'ultrafiltration. Le produit non ultrafiltré est ramené à 20 cm³.

Voici les résultats obtenus :

TABLEAU IV.

	Concentration diastatique C.D. U.D. p. 100 cm ³	Extrait sec en g. p. 100 cm ³	Activité C.D. extrait sec	Cendres sulfatées en g. p. 100 cm ³	Manganèse en mg. p. 100 cm ³	Titre en Mn $\frac{\text{Mn en } \gamma}{\text{U. D}}$
Suc dilué au 1/2.....	3.100	10,400	298	1,080	20	6,45
Suc carbonaté	2.920	12,950	225	2,650	1,8	0,615
Suc précipité par So ₄ Am ₂	4,900	1,200	4.083	0,018	0,18	0,037
Suc non ultrafiltrable.	7,500	0,501	15,000	0,011	0,075	0,010

La perte en activité est supérieure à 50 p. 100, ainsi les 250 cm³ de suc carbonaté représentent 3.720 unités diastasiques, les 40 cm³ provenant de la dissolution du

précipité obtenu par le sulfate d'ammonium, représentent 1.500 unités diastasiques.

L'activité du suc purifié n'est pas modifiée par addition de fer ou de manganèse.

CONCLUSIONS.

Toutes les expériences décrites ci-dessus ont été réalisées sur le suc préalablement déféqué au carbonate de sodium, les résultats obtenus montrent tout d'abord, une fois de plus l'intérêt très net du traitement de ce suc par le sulfate d'ammonium. Ce traitement, malgré les pertes d'activité qu'il provoque permet de concentrer l'activité diastasique tout en éliminant une portion importante des éléments minéraux. Il est facile de s'en rendre compte en comparant les résultats que donne l'ultrafiltration selon que l'on applique au suc simplement déféqué au carbonate de sodium ou bien à ce dernier, traité ensuite par le sulfate d'ammonium.

Dans le premier cas (tableau I) l'activité (nombre d'unités diastasiques pour 1 g. d'extrait sec) passe de 260 (suc brut) à 2048 et les cendres pour 100 cm³ de 3,04 à 0,410 tandis que dans le deuxième cas (tableau II) l'activité s'élève de 305 à 10.266 et les cendres tombent de 1 g.,175 à 0 g.,009 pour 100 cm³.

Les chiffres du tableau III sont analogues : L'activité qui, pour le suc brut était de 305, monte en fin d'opération à 10.266 (soit une augmentation de 1 à 34) malgré une perte qui atteint plus de 50 p. 100 de l'activité primitive. Par contre les cendres s'abaissent pour 100 cm³ de 1g.,175 à 9 mg. Enfin la teneur en cendres de l'extrait sec qui était de 1 g.,175 pour 10 g.,950 (soit 10,7 p. 100) se réduit à 9 mg. pour 750 mg. (soit 1,2 p. 100) l'élimination est donc de 90 p. 100 environ.

En ce qui concerne l'application de l'adsorption suivie d'élution à la solution soumise à l'ultrafiltration : le tableau I montre que l'opération n'est pas très intéres-

sante pour le but poursuivi par suite des pertes subies et de la nécessité d'éluer par une solution saline la diastase adsorbée.

Quant au fer et au manganèse nos tableaux montrent que l'élimination la plus importante de ces deux éléments est obtenue par action successive du carbonate de sodium et du sulfate d'ammonium. L'action subséquente de l'ultrafiltration, qui permet une concentration intéressante de l'activité, n'amène pas un résultat aussi net au point de vue de l'élimination des métaux lourds. Le taux de fer est réduit à un degré tel que, dans les conditions de nos expériences, il ne peut plus être décelé. Quant au manganèse son taux se maintient aux environs de 0,010 par unité diastasique, ce qui représente (le taux dans le suc primitif étant à peu près de 6) environ 1,7 p. 100 du manganèse primitif.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

Dans ce travail, consacré à la purification de la lac-case à partir du suc d'arbre à laque du Tonkin (Nuoc'Son) et comportant une mise au point des techniques de dosage du fer et du manganèse, nous avons établi les faits suivants :

1° le traitement du suc d'arbre à laque (Nuoc'Son) par le carbonate de sodium permet d'obtenir, après séparation du précipité, un liquide ayant conservé pratiquement son activité oxydasique primitive et débarrassé d'une grande partie de ses impuretés en même temps que de 85 à 90 p. 100 de son manganèse.

2° La saturation au moyen du sulfate d'ammonium, des solutions traitées au préalable par le carbonate de sodium, provoque la formation d'un précipité qui retient une grande partie de l'activité diastasique, tandis que les impuretés minérales et une grande partie du manganèse restent en solution.

3° Si l'on soumet à la dialyse les préparations diastasiques précédentes (sucs déféqués au carbonate de sodium ou solutions des précipités obtenus par le sulfate d'ammonium) l'activité oxydasique reste pour sa plus grande partie sur la membrane, tandis que les impuretés salines introduites par les réactifs précédents s'éliminent.

4° L'adsorption intégrale de l'activité oxydasique par l'alumine, peut être obtenue à condition d'opérer sur un suc déjà purifié par le carbonate de sodium, et suffisamment dilué.

Le pH optimum d'adsorption est d'environ 5. L'élu-

tion peut être obtenue en milieu alcalin aux environs de pH 9. Elle atteint au maximum 75 p. 100. L'activité des produits ainsi obtenus est augmentée tandis que leur titre en fer et en manganèse est encore diminué.

5° Les ultrafiltres à membranes de collodion convenablement préparés retiennent toute l'activité des sucres d'arbre à laque déféqués au carbonate de sodium, et laissent passer une grande partie des impuretés, surtout si l'ultrafiltration est pratiquée aux environs de pH 4,8 et si le résidu est longuement lavé à l'eau distillée, on élimine en même temps une fraction importante du manganèse. On voit ainsi l'activité de la préparation augmenter et le titre de fer et de manganèse diminuer considérablement.

6° Si l'on combine ces diverses méthodes, les meilleurs résultats sont obtenus en soumettant à l'ultrafiltration, la solution du précipité que donne le sulfate d'ammonium dans le suc préalablement déféqué par le carbonate de sodium, dans ces conditions, malgré les pertes inévitables, on peut obtenir des préparations dont l'activité atteint 50 fois l'activité primitive, tandis que 90 p. 100 des cendres sont éliminées, le fer n'est plus décelable à nos réactifs, et la teneur en manganèse exprimée en γ par unité diastasique passe de 6 γ à 0 γ 01 environ. Pour mettre en évidence la purification obtenue on peut dire que en partant d'un suc dont 1 gramme d'extrait sec renferme 305 unités avec une quantité de fer du même ordre, on peut obtenir finalement un produit dont 1 gramme correspond à 10.260 unités diastasiques avec 1,2 p. 100 de cendres et seulement 0,066 p. 1.000 de manganèse avec des quantités de fer non dosables.

7° Malgré leur netteté, les faits résumés ci-dessus en ce qui concerne l'élimination des métaux lourds, ne permettent pas de conclusions fermes relativement au rôle de ces métaux dans l'activité oxydasique de nos prépa-

rations le fait d'avoir pu en éliminer une quantité considérable en maintenant l'activité diastasique est seul à retenir. Il montre qu'une très forte proportion de ces métaux ne joue certainement aucun rôle dans l'activité actuelle de nos sucs, il faut noter toutefois en ce qui concerne le fer, que la réaction utilisée est environ 10 fois moins sensible que celle du manganèse, ce qui suffit à expliquer que le fer ne puisse plus être décelé dans les préparations les plus pures qui donnent encore la réaction du manganèse.

Pour l'interprétation des faits, il est essentiel de remarquer que le problème du rôle du fer dans les peroxydases s'est présenté sous le même aspect. En effet WILLSTÄTTER après avoir conclu dans un premier mémoire avec STOLL [118] que la teneur en fer de ses préparations variait parallèlement à leur activité, était amené, par une étude plus poussée, à admettre avec POLLINGER [115] qu'il n'y avait aucun rapport entre la quantité du métal et l'activité diastasique. Une nouvelle technique de purification avait en effet permis à ces auteurs, d'obtenir des préparations très actives bien que très pauvres en fer (0,06 p. 100), par la suite l'étude spectroscopique de ces préparations très pures, amena R. KUHN, B. HAND et M. FLORKIN [70] à y déceler la présence d'un pigment voisin de l'hémine en quantité à peu près proportionnelle à l'activité diastasique, et il résulte de leurs déterminations que, dans ce cas, le fer sous forme « Héminique » ne serait que le 1/7^e du fer total contenu dans la préparation diastasique, les 6/7 de ce fer pourraient ainsi être éliminés sans que diminue l'activité de la peroxydase et malgré cela, il semble bien qu'on puisse attribuer cette activité à la présence d'un composé ferrugineux.

D'ailleurs dans le cas de la catalase, que de récentes recherches ([29] bis) permettent de considérer comme résultant de l'union de la protohématine à un support colloïdal, le dosage du fer des cendres n'a pu suffire à

éclaircir la constitution de cette diastase. Les recherches d'EULER et de ses élèves avaient montré qu'il n'y avait pas de rapport fixe entre l'activité catalasique des préparations purifiées et la teneur en fer des cendres. En substituant aux techniques chimiques les techniques spectrophométriques plus sensibles ZEILE et HELLSTRÖM ont pu montrer qu'il y avait un net parallélisme entre l'activité catalasique des échantillons purifiés de cette diastase et leur teneur en fer combiné à des porphyrines.

C'est d'ailleurs en associant aux techniques chimiques d'investigation les techniques physiques plus fines et plus sensibles que l'on a pu au cours de ces dernières années éclaircir la constitution de certaines diastases ([29] bis — [29] ter) catalase, peroxydase, ferment jaune, deshydrogénases.

Il est permis d'espérer que l'application de certaines de ces techniques à la laccase purifiée permettra peut-être d'en préciser la constitution intime .

Vu, Bon à imprimer :

Le Président du Jury,

HENRI HÉRISSEY.

Vu :

Le Doyen de la Faculté,

A. DAMIENS. *

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

G. ROUSSY.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

1. AMBARD (L.). — Sur l'amylase. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1921, 3, 51. — De l'amylase. Liaison du ferment et des substances qu'il digère. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1923, 5, 693.
2. AUBEL et GENEVOIS. — L'état actuel de la question des ferments. *Mémorial des Sc. Physiques*. Fascicule VII-1929 (Gauthier-Villars, éditeur).
3. BACH (A.). — Neuere Methode zur schnellen Verarbeitung von Pflanzenextrakten auf Oxydationsfermente. *Ber. dtsh. Chem. Ges.*, 1910, 43, 363. — Zur theorie der Oxydasewirkung. I. Mangan und eisenfreie Oxydasen. *Ber. dtsh. Chem. Ges.*, 1910, 43, 364. — II. Einfluss der Metallsalze auf die weitere Umwandlung der Produkte der Oxydasewirkung. *Ber. dtsh. Chem. Ges.*, 1910, 43, 366.
4. BACH (A.). — Du rôle des peroxydes dans les phénomènes d'oxydation lente. *C. R.*, 1913, 156, 1853.
5. BACH (A.) et CHODAT (R.). — Untersuchungen über die Rolle des Peroxyde in der Chemie der lebenden zelle. Ueber Peroxydasen. *Ber. dtsh. Chem. Ges.*, 1903, 36, 600. — Ueber Peroxydasen. Zerlegung der sogenannten oxydasen inoxygenasen und peroxydasen. *Ber. dtsh. Chem. Ges.*, 1903, 36, 606.
6. BACH (A.) et TSCHERNIACK. — Zur Reinigung der Peroxydase. *Ber. dtsh. Chem. Ges.*, 1908, 41, 2345.
7. MAC BAIN (J. W.). — Der Mechanismus der Adsorption (Sorption) von Wasserstoff. durch Kohlenstoff. *Z. Physiol. Chem.*, 1909, 68, 471.
8. BATTELI (F.) et STERN (L.). — Die oxydations fermente. *Erg. Physiol.*, 1912, 12, 96.
9. BAYLISS. — The nature of Enzyme Action. 5^e édition, 1925 (Londres, Longman, Green and C^o).
10. BECHHOLD. — *Z. Physiol. Chem.*, 1906, 48, 376.
11. BECHHOLD. — Die Kolloide in der Biologie. 1920 (Steinbock, éditeur).
12. BERTIAUX. — Sur le dosage du manganèse. *Chim. et Industrie*. Numéro spécial septembre 1925, p. 118.
13. BERTRAND (G.). — Sur la laccase et le pouvoir oxydant de cette diastase. *C. R.*, 1895, 120, 266 et *Bull. Soc. Chim.*, 1895, 13, 361.

14. BERTRAND (G.). — Sur le latex de l'arbre à laque. *C. R.*, 1894, 118, 1215. — Recherches sur le latex de l'arbre à laque du Tonkin. *Bull. Soc. Chim.*, 1894, 11, 717.
15. BERTRAND (G.). — Sur la recherche et la présence de la laccase chez les végétaux. *C. R.*, 1895, 121, 164.
16. BERTRAND (G.). — Sur l'intervention du manganèse dans les oxydations provoquées par la laccase. *C. R.*, 1897, 124, 1032.
17. BERTRAND (G.). — Sur l'action oxydante des sels manganeux et sur la constitution chimique des oxydases. *C. R.*, 1897, 124, 1355.
18. BERTRAND (G.) et MALLEVRE. — Sur le rôle du calcium dans la fermentation pectique. *C. R.*, 1894, 119, 1012. — Sur la pectase et sur la fermentation pectique. *C. R.*, 1895, 120, 110.
19. BERTRAND (G.). — Sur le pouvoir oxydant des sels manganeux et sur la constitution chimique de la laccase. *Bull. Soc. Chim.*, 1897, 17, 753.
20. BERTRAND (G.). — Dosage du manganèse dans la matière organique. *Ann. Chim. Analytique*, 1911, 9, 285.
21. BERTRAND (G.). — Sur l'oxydation du gaïacol par la laccase. *C. R.*, 1903, 137, 1269.
22. BERTRAND (G.). — Sur la présence simultanée de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. *C. R.*, 1896, 123, 463.
23. BIERRY (H.), GIAJA et HENRI (V.). — Inactivité amylolytique du suc pancréatique dialysé. *C. R. Soc. Biol.*, 1906, 58, 479.
24. BOURQUELOT. — Nouvelles recherches sur le ferment oxydant les champignons. *J. Pharm. Chim.*, 1896, 4, 145, 241, 440.
25. BOURQUELOT (Em.) et BERTRAND (G.). — La laccase des champignons. *C. R.*, 1895, 121, 783.
26. BROOKS (G.). — Laccase et laccol. 1 volume. *Actualités scientifiques et industrielles*. Hermann, éditeur, Paris, 1934.
27. BRUCKE (E.). — *Vorles über physiologie*, 1874, 1294.
28. CANALS (E.) et HORTALA (A.). — A propos des essais colorimétriques. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1932, 14, 1273.
29. COHNHEIM (J.). — *Virchow archs.*, 1863, 28, 241.
- 29 bis. COURTOIS (J.) et TRUHAUT (R.). — Récents acquisitions sur la constitution et les modalités d'action d'une diastase : la catalase. *Journ. Pharm. Chim.*, 1937, 25, 398.
- 29 ter. COURTOIS (J.). — Nos connaissances actuelles sur la constitution et le mécanisme d'action des diastases. *La Pharmacie Française*, 1938, 42, n° mars, avril, mai.

30. COURTOIS (J.). — *Th. Doct. Univ. Pharm.*, Paris, 1932.
31. DELAVILLE et BLUM. — *C. R. Soc. Biol.*, 1924, 91.
32. DENIGES (G.). — Etude sur la réaction permanganique du manganèse et sur une nouvelle technique permettant de la réaliser en milieu fortement chloruré tel que les eaux marines. *Bull. Soc. Chim. France*, 1922, 51, 380.
33. DENIGES (G.). — La formaldoxine réactif très sensible des métaux du groupe du fer et notamment du manganèse. Applications diverses (eaux minérales). *C. R.*, 1932, 194, 895.
34. EDER (A.) et EDER (H.). — *Ann. Chim. anal.*, 1923, 5, 133.
35. EFFRONT (J.). — Influence de la filtration sur l'amylase. *C. R. Soc. Biol.*, 1922, 86, 271.
36. ELLIOTT (K.) et KEILIN (D.). — *Proc. Roy. Soc. Londres* série B, 1934, 114, 210.
37. EULER (H.). — *Chemie der Enzyme*. 3^e édition. 3 volumes in-8°. (Munich, Bergsmans, 1925).
38. EULER (H.) et BOLIN (J.). — Zur Kenntnis biologischer wichtiger Oxydationen. *Z. Physiol. Chem.*, 1908, 57, 80 et 1909, 61, 72 ; 1910, 69, 187.
39. EULER (H.) et ERIKSON (R.). — Zur Kenntnis der Sorptionsfähigkeit von Aluminiumhydroxyd. *Z. Physiol. Chem.*, 1923, 128, 9. — Einige Versuche zur Kenntnis der Sorptionsfähigkeit von Aluminiumhydroxyd. *Z. Physiol. Chem.*, 1923, 128, 1.
40. EULER (H.) et JOSEPHSON (K.). — Saccharase. *Ber. dtsch. Chem. Ges.*, 1923, 56, 1907 et 1924, 57, 299. — Ueber Katalase. I. *Ann. der. chem.*, 1927, 452, 158. — Ueber Katalase. II. *Ann. der chem.*, 1927, 455, 1.
41. EULER (H.) et JOSEPHSON (K.). — Die Saccharase als amphoterer Elektrolyt und als Kolloid. *Z. Physiol. Chem.*, 1924, 133, 297.
42. EULER (H.) et MYRBACH (K.). — Sorption von Saccharase durch Tonerdehydrat. *Z. Physiol. Chem.*, 1924, 127, 115.
43. FABRE (R.). — Les méthodes actuelles de la purification des enzymes par adsorption. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1923, 5, 432.
44. FABRE (R.). — L'adsorption en Biologie. *J. Pharm. Chim.*, 1930, 11, 529, 584.
- 44 bis. FLEURY (P.). — Les diastases. Exposés annuels de biochimie médicale. Paris, 1938.
45. FLEURY (P.). — Technique pour le dosage du fer dans le sang. *J. Pharm. Chim.*, 1929, 9, 561.
46. FLEURY (P.). — *Th. Doct. Sc.*, Paris, 1924.
- 46 bis. FLEURY (P.) et CAMPORA (C.). — Recherches sur la laccase. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1934, 16, 1589.

47. FLEURY (P.) et MARQUE (J.). — La molybdomanganimétrie des sels de fer ; son mécanisme et ses limites. *Journ. Pharm. Chim.*, 1929, 8, 479. — Dosage du fer sanguin par molybdomanganimétrie. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1929, 12, 1125.
48. FONTÈS (G.) et THIVOLLE (L.). — La molybdomanganimétrie et ses applications. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1923, 5, 325.
49. GIEMSA. — *Physik. Chem.*, 1906, 60, 507.
50. GRABAR. — *C. R. Soc. Biol.*, 1930, 104, 398.
51. GUYARD et WOLHARD. — *Bull. Soc. Chim.*, 1864, 1, 88.
52. HAMMARSTEN (O.). — D'après KOPACZEWSKI. *Traité de Biocolloïdologie*. Tome III.
53. HARDEN (A.) et YOUNG (W. J.). — The alcoholic ferment of Yeast Juice. *Proc. Roy. Soc.*, 1906, 77, B-405. — The alcoholic ferment of Yeast Juice. part II. The coferment of Yeast Juice. *Proc. Roy. Soc.*, 1906, 78, 369.
54. HEDIN. — Über die aufnahme von Trypsin durch verscheidene substanzen. *Ztschr. für physiol. chem.*, 1907, 50, 497. — A case of spécific adsorption of enzymes. *Biochem. Jl*, 1907, 2, 112.
55. HENAULT (D.). — Contribution à l'étude méthodique des oxydases. *Bull. Sc. Ac. Roy. Belg.*, 1907, 9, 537 ; 1908, 10, 105.
56. HÉRISSEY (H.). — *Thèse Doct. Univ. Paris* (Pharmacie), 1899, p. 80-81.
57. HENNICH (S.). — Studien über Leberkatalasen. *Biochem. Z.*, 1924, 145, 286. — Zur Kenntnis der Katalase und ihrer Beziehung zur biologische oxydationen. *Biochem. Z.*, 1926, 171, 314.
58. HIRTH et TCHIEMBER. — *C. R. Soc. Biol.*, 1934, 91, 392.
59. HOLDERER. — *Thèse Doct. Univ. Paris* (Science), 1911.
60. HUDSON (C. S.) et PAINE. — The inversion of Cane sugar By invertase. IV. The influence of acids and alkalis on the activity of invertase. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1910, 32, 774.
61. HUGOUNECQ et LOISELEUR (J.). — I. Recherches expérimentales sur l'action catalytique de certains colloïdes et particulièrement du glycogène, comparée aux phénomènes diastatiques. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1924, 6, 791. — II. Sur la constitution des diastases protéolytiques et le mécanisme de leur action. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1925, 7, 955. — III. Sur la biochimie des Electrolytes. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1926, 8, 611. — IV. De l'adsorption élective des colloïdes. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1926, 8, 523.

62. ISCOVESCO (H.). — Introduction à l'étude de la spécificité cellulaire. Le transport du ferment gastrique à travers les colloïdes. *C. R. Soc. Biol.*, 1907, 62, 770. — Studien über Kataphorese von Fermente und Kolloiden. *Biochem. Z.*, 1910, 24, 53.
63. ISSAJEW (H.). — Über die Malzoxydase. *Z. Physiol. Chem.*, 1905, 45, 331.
- 63 bis. ITOH (R.). — *J. Biochem. Japan*, 1936, 23, 125.
- 63 ter. KJELDAHL. — Recherches sur les ferments producteurs de sucre. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, 1881, 186 (d'après P. FLEURY).
64. KOPACZEWSKY (W.). — Catalyse et ses applications. (Paris, 1925. Vigot).
65. KOPACZEWSKY (W.). — Traité de Biocolloïdologie. Tome III. Paris, 1932. (Gauthier-Villars).
66. KOPACZEWSKY (W.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1915, 29, 157.
67. KRAUT (H.) et WENZEL. — *Z. Physiol. Chem.*, 1924, 133, 1.
68. KRAUT et BAUER (E.). — Zur Kenntniss des Papains. *Z. Physiol. Chem.*, 1927, 164, 10.
69. KRAUT (H.) et RUBENBAUER (H.). — Ueber Leberesterase. *Z. Physiol. Chem.*, 1927, 173, 103.
der Peroxydase. *Zeitschr. für Physiol. Chem.*, 1931, 201, 255.
71. LE BRETON (E.). — Récentes acquisitions sur les enzymes protidolytiques du pancréas et de l'intestin. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1932, 14, 417.
72. LEPINOIS. — Note sur les ferments oxydants de l'aconit et de la belladone. *J. Pharm. Chim.*, 1899, 6, 49.
73. LUMIÈRE (A. et S.) et CHEVROTIER. — Action des oxydases artificielles sur la toxine tétanique. *C. R.*, 1904, 138, 652.
74. MADINAVEITIA. — Thèse Zurich, 1912.
75. MAGNUS (R.). — Zur Wirkungsweise des esterspaltenden Fermentes (Lipase) der Leber. *Z. Physiol. Chem.*, 1904, 42, 149. — Die Wirkung synthetischer gallensauren auf die pankreatische Fettsplaltung. *Z. Physiol. Chem.*, 1904, 48, 376.
76. MALAPRADE (M. L.). — Contribution au dosage du manganèse dans les produits ferreux. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1932, 51, 241.
77. MARSHALL (H.). — *Chemical News*, 1901, 83, 76.
78. MATHEVET. — *Ann. Chim. Anal.*, 1923, 5, 1335.
79. MEYERHOF. — *Pflug. Arch.*, 1914, 157, 251.
80. MICHAELIS (L.). — Die adsorptionen affinitäten des Hefe-Invertins. *Biochem. Z.*, 1907, 1908, 7, 488.

81. MICHAELIS (L.). — Nachtrag zur adsorptions analyse der Fermente. *Biochem. Z.*, 1908, 12, 26.
82. MICHAELIS (L.) et EHRENREICH. — Die Adsorptions analyse der Fermente. *Biochem. Z.*, 1908, 10, 283.
83. MAJIMA (R.) et TAKAYAMA (G.). — Über den hauptbestandteil des Japanlacks. Der Urushiol-monométhyläther und der Mechanismus der Oxydation des Urushiols. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1920, 53, 1907.
- 83 bis. MIYAKE et ITO. — D'après HALDANE et STERN. Allgemeine, Chemie der Enzyme. Dresde, 1932.
84. NORTHROP (J. H.) et KUNITZ (M.). — Isolation and properties of crystalline Trypsin. *Ergebnisse der Enzymforschung*, 1933, 2, 104.
85. NORTHROP (J. H.). — The inactivation of trypsin. IV. The adsorption of trypsin by charcoal. *Journ. of Gen. Physiol.*, 1923, 5, 751.
86. OPPENHEIMER (O.). — Die Enzyme und ihre Wirkungen. 6^e édition, 2 volumes, 1926. (Leipzig, G. Thieme).
87. OPPENHEIMER (O.) et PINCUSSEN. — Die methodik der fermente. (G. Thieme, Leipzig). 1928.
88. PIETTRE et VILLA. — La dialyse sur sirop simple. Application à la séparation du Fibrinogène. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1914, 1, 58 ; *C. R.*, 1913, 156, 1853.
89. PROCTER SMITH. — Dosage du manganèse. *Chem. News.*, 1904, 90, 237.
90. RONSENFELD (R.). — L'oxydase du Rettichwiesel. St.-Petersbourg (1906), d'après A. BACH. *Ber. dtsh. Chem. Ges.*, 1910, 43, 464.
91. SARTHOU (M. J.). — Sur une oxydase retirée du *Schinus molle*. *J. Pharm. Chim.*, 1900, 11, 482 et 1900, 12, 104.
92. SHERMANN, CADERWELL et ADAMS. — Studies on Amylases. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1926, 48, 2947.
93. SIGAUD. — Ultrafiltration, dialyse, osmose, au moyen de sacs en collodion. *Ann. Inst. Pasteur*, 1929, 43, 190.
94. SLOWTZOFF (B.). — Zur Kenntnis der pflanzlichen oxydasen. *Z. Physiol. Chem.*, 1900, 31, 227.
95. SPITZER. — *Arch. Ges. Phys.* (Pflüger), 1897, 67, 615.
96. STARKENSTEIN (E.). — Eigenschaften und Wirkungsweise der diastatischen Fermentes der Warmbluter. *Biochem. Z.*, 1910, 24, 191. — Ueber Fermentwirkung und deren Beeinflussung durch Neutralsalze. *Biochem. Z.*, 1910, 24, 210.
97. STOECKLIN (E. de). — Contribution à l'étude de la peroxydase. *Thèse Doct. Univers. Genève*, 1907.
98. SULLIVAN (O.) et TOMPSON (F. N.). — Invertase. *Journ. Chem. Soc.*, 1890, 57, 844.

- 98 bis. SUMNER (J. B.) et HOWELL (S. F.). — *Enzymologia*, 1936, 1, 133.
99. SUMINOKURA. — Ueber die Laccase des Japanischen Laks. *Biochem. Z.*, 1930, 234, 292.
- 99 bis. TAMAI (M.). — *J. Biochem. Japan*, 1936, 23, 1.
100. TSCHIRCH et STEVENS (A. B.). — Ueber den Japanlaks (Ki-urushi). *Arch. d. Pharm.*, 1905, 243, 504.
101. THOMS et Mlle KELLY. — Vorrichtung zur Beschleunigung der Dialyse. *Ber. dtsh., Chem. Ges.*, 1917, 50, 1235. — Über die Herstellung haltbaren Fruchtextrakte, welche die Aromastoffe und Fermente von Fruchtsäften in unzersetzter Form enthalten. *Ber. dtsh. Chem. Ges.*, 1917, 50, 1240.
102. TRAVERS. — Dosage du manganèse. *Ann. Chim.*, 1926, 6, 56.
103. TRILLAT. — I. Influence activante ou paralysante, agissant sur le Mn comme ferment catalytique. *C. R.*, 1903, 137, 922. — II. Influence activante d'une matière albuminoïde sur l'oxydation provoquée par le manganèse. *C. R.*, 1904, 138, 94. — III. Sur le rôle d'oxydases qui peuvent jouer les sels de manganèse en présence d'un colloïde. *C. R.* 1904, 138, 274.
104. VADAM. — Ferments oxydants de l'hellébore fétide. *J. Pharm. Chim.*, 1899, 6, 375.
105. VALETTE (G.). — Les tentatives de purification des ferments. *Bull. Sc. pharmacol.*, 1931, 2, 108.
106. VAN DER HAAR (A. W.). — Die Entbehrlichkeit des Mangans für das Oxydasenmolekül bei der Zucht von *Hedera helix* und die Bertrands. *Biochem. Z.*, 1921, 113, 19. — Untersuchungen über Pflanzen-Peroxydasen. Eine neue Methode der Peroxydase-Gewinnung. *Ber. dtsh. Chem. Ges.*, 1910, 43, 1321. — Die Ephren-Peroxydase ein glucoprotein und G. Wokers Aldehyd-Hypothese der Peroxydasen. *Ber. dtsh. Chem. Ges.*, 1917, 50, 303.
107. WALDSCHMIDT-LEITZ (E.). — Ueber Enterokinase und die tryptische Wirkung der Pankreasdrüse. *Z. physiol. Chem.*, 1924, 132, 181.
108. WALDSCHMIDT-LEITZ, SCHÄFFNER et GRASSMAN (W.). — Über die Struktur des Clupeins. *Z. physiol. chem.*, 1926, 156, 68.
109. WILLSTÄTTER (R.). — Ueber Fortschritte in der Enzyme Isolierung. *Ber. dtsh. Chem. Ges.*, 1926, 59, 1.
110. WILLSTÄTTER (R.). — Ueber Peroxydase. *Liebig. Annal.*, 1921, 42, 47.
111. WILLSTÄTTER (R.) et BAMANN (E.). — Erennung von Maltase und Saccharase. *Z. physiol. chem.*, 1926, 151, 273.

112. WILLSTÄTTER (R.), GRASER et KUHN. — Zur Kenntnis des Invertins. *Z. physiol. chem.*, 1922, 123, 1.
 113. WILLSTÄTTER (R.) et GRASSMAN. — Ueber die Proteasen der Hefe. *Z. für physiol. chem.*, 1926, 153, 250.
 114. WILLSTÄTTER (R.) et KRAUT. — *Ber. dtsh. Chem. Ges.*, 1923, 56, 1 ; 119, 1117-2451.
 115. WILLSTÄTTER (R.) et POLLINGER. — Über Peroxydase. *Lieb. Ann.*, 1923, 430, 269.
 116. WILLSTÄTTER (R.) et RACKE. — Zur Kenntnis des Invertins. *Lieb. Ann.*, 1921, 425, 1 ; 1922, 425, 11.
 117. WILLSTÄTTER (R.), SCHNEIDER (K.) et WENZEL (E.). — Zur Kenntnis des Invertins. *Z. für physiol. chem.*, 1926, 151, 1.
 118. WILLSTÄTTER (R.) et STOLL. — Über peroxydase. *Lieb. Ann.*, 1918, 416, 21.
 119. WILLSTÄTTER (R.) et WALDSCHMIDT-LEITZ. — Über Pankreaslipase. *Z. physiol. chem.*, 1923, 125, 132.
 120. WILLSTÄTTER (R.); WALDSCHMIDT-LEITZ et ALBERT R. F. HESSE. — Ueber das Adsorptionsverhalten des Pankreas-amylase. *Z. physiol. chem.*, 1925, 142, 14.
 121. WILLSTÄTTER (R.) et WASSERMAN. — Zur Kenntnis des Invertins. *Z. physiol. chem.*, 1922, 123, 181.
 122. WOLFF (J.). — Contribution à la connaissance des divers phénomènes oxydasiques naturels et artificiels. *Thèse Doct. Univ. Paris (Science)*, 1910.
 123. WOLFF (J.) et STOECKLIN (E. de). — Contribution à l'étude des enzymes oxydants. *Ann. Inst. Pasteur*, 1909, 11, 841.
 124. YOSHIDA. — On Urushi Lacquer. *Journ. Chem. Soc.*, 1883, 472.
-

TABLE DES MATIÈRES.

	Pages
INTRODUCTION.	
Travaux de G. Bertrand	9
Théorie de G. BERTRAND.....	12
A. Travaux en accord avec la théorie de G. BER- TRAND	14
I) Travaux de TRILLAT	14
II) Travaux de L. HUGOUNECQ et LOISELEUR..	14
Rôle du fer dans l'action des oxydases.....	15
I) Travaux de SARTHOU	16
II) Travaux de J. WOLFF	17
B. Travaux en désaccord avec la théorie de G. BER- TRAND	17
I) Travaux de SLOWTZOFF	17
II) Travaux de ISSAJEW	17
III) Travaux de DONNY HENAULT	17
IV) Travaux de A. BACH	18
V) Travaux de VAN DER HAAR	18
VI) Travaux de SUMINOKURA	19
Critiques adressées à la théorie de G. BERTRAND..	21
Critiques des travaux défavorables à la théorie de G. BERTRAND	22

PREMIÈRE PARTIE.

Techniques utilisées	27
CHAPITRE PREMIER	29
Mesure de l'activité de la laccase	29
Méthode de P. FLEURY	31

CHAPITRE II	35
Dosage du fer	35
Méthode colorimétrique	35
Principe de la méthode. Conditions de son emploi	36
Proportionnalité entre l'intensité de la coloration et la teneur en fer	38
Importance de la rapidité de l'examen colorimétrique	39
Stabilisation de la coloration	39
Technique	40
Vérification de la méthode	40
Conclusions	41
Dosage du fer dans la matière organique....	41
CHAPITRE III	42
Dosage du manganèse	42
I. — Oxydation du sel manganeux en acide permanganique	43
Conditions à remplir pour une oxydation totale	43
A. Action du persulfate de potassium sur l'acide permanganique	43
B. Action du sel manganeux sur l'acide permanganique	43
1° Nature et concentration de l'acide à utiliser	44
Résultats	45
Conclusions	46
2° Quantité de persulfate à utiliser pour obtenir une réaction complète	46
3° Quantité de nitrate d'argent à utiliser.	47
Conclusions	47
II. — Dosage volumétrique du manganèse	48
Réactifs utilisés	49

a) Technique	49
b) Oxydation du manganèse	49
c) Dosage de l'acide permanganique	50
Application au dosage volumétrique du manganèse dans le suc d'arbre à laque	53
III. — Dosage colorimétrique du manganèse....	54
Technique A	55
Technique B	55
Technique C	56
Dosage colorimétrique du manganèse dans le suc d'arbre à laque	57

DEUXIÈME PARTIE.

Suc de laque. — Laccase	59
I. — Propriétés physiques	60
II. — Propriétés chimiques et composition....	60
III. — La laccase est-elle une diastase?.....	63
a) Précipitation par l'alcool, par l'acétone.	64
b) Action de la chaleur	64
c) Existence d'un optimum de réaction..	66
IV. — Précautions à prendre pour mesurer l'activité de la laccase	67
V. — Conservation des préparations diastasiques	67
MÉTHODES DE PURIFICATION DE LA LACCASE	69
Mode d'expression et de présentation des résultats	70
CHAPITRE PREMIER	73
Méthodes de précipitation	73
I. — PRÉCIPITATION PAR L'ALCOOL ET PAR L'ACÉ- TONE	75
A. Action de l'alcool et de l'acétone sur la lac- case	76

B. Purification de la laccase par l'alcool et l'acétone	76
C. Technique de la précipitation	77
D. Précipitation de la laccase par de grandes quantités d'alcool ou d'acétone	77
E. Précipitation de la laccase par de petites quantités d'alcool ou d'acétone	79
Conclusions	81
II. — PRÉCIPITATION PAR LE CARBONATE DE SODIUM	82
A. Technique de la précipitation	82
B. Etude de l'action du carbonate de sodium sur le suc d'arbre à laque	83
C. Action des quantités croissantes de carbonate de sodium sur nos préparations diastasiques	86
D. Autres avantages de la précipitation par le carbonate de sodium	88
a) Stabilisation de nos préparations fermentaires	88
b) Variation de la réaction du milieu	88
Conclusions	90
III. — PRÉCIPITATION PAR UN SEL NEUTRE : SULFATE D'AMMONIUM	92
Etude et technique de la précipitation par le sulfate d'ammonium	93
Conclusions	98
CHAPITRE II	99
DIALYSE	99
A. Inconvénients de la dialyse	99
B. Purification des diastases par la dialyse..	101
C. Purification de la laccase par la dialyse..	102
Conclusions	104

CHAPITRE III	106
ULTRAFILTRATION	106
A. Principe et but de l'ultrafiltration	107
B. Application de l'ultrafiltration. Purification des diastases	108
C. Appareils utilisés	108
a) Préparation du collodion	109
b) Technique utilisée	110
c) Vérification du système ultrafiltrant..	111
D. Ultrafiltration de la laccase	112
E. Ultrafiltration de la laccase en fonction du pH	115
Conclusions	119
CHAPITRE IV	121
ADSORPTION ET ELUTION	121
A. Historique de l'adsorption des diastases..	122
B. Théories de l'adsorption	128
C. Théories de l'élution	131
D. Les facteurs de l'adsorption	133
a) Influence de la pureté des diastases..	133
b) Influence de la réaction du milieu	135
c) Influence de la dilution	136
d) Influence de certaines substances.....	137
E. Marche à suivre pour réaliser une adsorp- tion	137
Préparations des adsorbants	138
I. — Gels d'alumine	139
a) Orthohydroxydes	140
b) Polyhydroxydes	141
II. — Préparations de Kaolin	142
Valeur d'adsorption	143

APPLICATIONS. — PURIFICATION DE LA LACCASE PAR	
ADSORPTION ET ELUTION	144
Adsorption de la laccase	144
a) Préparations de laccase utilisées	144
b) Choix des adsorbants	145
c) Technique utilisée	145
I. — Adsorption du suc de laque brut	146
II. — Adsorption du suc de laque préalablement précipité par l'acétone	147
III. — Adsorption du suc préalablement traité par le carbonate de sodium	147
IV. — Adsorption du suc préalablement traité par le carbonate de sodium, puis par deux précipitations acétoniques	147
a) Préparation du suc purifié	148
b) Obtention des divers pH	148
c) Adsorption	149
Résultats et courbe représentative	149
V. — Adsorption par l'alumine B du suc purifié par le carbonate de sodium et par dialyse	150
1° Essai d'adsorption par l'alumine B du suc carbonaté et dialysé	151
a) Préparation du suc dialysé	151
b) Obtention des divers pH	152
c) Mode opératoire	152
Résultats et courbe représentative	153
2° Essai d'adsorption d'un suc carbonaté dialysé par l'alumine B	154
a) Obtention des divers pH	155
b) Mode opératoire	155
Résultats et courbe représentative	156
Etude de l'adsorption en fonction du temps et en fonction de la quantité d'alumine B.	157
a) Adsorption en fonction du temps	158

b) Adsorption en fonction de la quantité d'alumine B	158
Conclusions	159
Elution de la laccase adsorbée	159
Essais d'élution	160
Adsorption sur Alumine A et Alumine C....	161
Purification de la laccase par adsorption et élution	162
Essai réalisé avec l'alumine B.....	162
Essai réalisé avec l'alumine C.....	163
Conclusions sur l'adsorption	163

TROISIÈME PARTIE.

Purification de la laccase par des méthodes associées. Variation du fer et du manganèse au cours de cette purification.....	165
I. — Purification de la laccase en associant à la précipitation par le carbonate de sodium et la précipitation acétonique	167
Résultats	168
II. — Purification de la laccase après défécation au carbonate de sodium, par ultrafiltration, adsorption et élution	169
Résultats	170
III. — Purification de la laccase, après défécation au carbonate de sodium, par précipitation au sulfate d'ammonium et ultrafiltration	171
1° Essai	171
2° Essai	172
Conclusions	173
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	175
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	179

IMPRIMERIE M. DECLUME
LONS-LE-SAUNIER.

